

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI “FEDERICO II”



DOTTORATO DI RICERCA IN
BIOLOGIA APPLICATA
XX CICLO

TESI

**Esposizione di proteine eterologhe sulla superficie
di spore di *Bacillus subtilis***

Coordinatore:
Ch.ma Prof.ssa
Amalia Virzo De Santo

Candidata:
dott.ssa Donatella Scotto Di Mase

Tutor:
Ch.mo Prof. Ezio Ricca

INDICE

1. Introduzione	pag.1
1.1 Sistemi di esposizione di antigeni eterologhi e loro applicazioni	pag.2
1.2 La spora	pag.12
1.2.1 Organizzazione strutturale della spora	pag.13
1.2.2 I componenti proteici della tunica sporale	pag.21
1.2.3 Assemblaggio dei componenti della tunica sporale	pag.25
1.3 La spora come sistema di esposizione di antigeni eterologhi	pag.29
1.3.1 CotB come proteina <i>carrier</i>	pag.33
1.3.2 CotC come proteina <i>carrier</i>	pag.38
1.3.3 CotG come proteina <i>carrier</i>	pag.41
1.4 Scopo della tesi	pag.45
2. Materiali e Metodi	pag.50
2.1 Ceppi batterici	pag.51
2.2 Terreni di coltura	pag.52
2.3 Tamponi di corsa per elettroforesi	pag.53
2.4 Purificazione di DNA plasmidico su larga scala	pag.53
2.5 Digestione enzimatica	pag.54
2.6 Elettroforesi su gel di agarosio	pag.55
2.7 Eluizione del DNA da gel di agarosio	pag.56
2.8 Reazione di ligasi	pag.56
2.9 Preparazione di cellule competenti e trasformazione di <i>E. coli</i>	pag.57

2.10 Preparazione del DNA e reazioni di sequenza	pag.58
2.11 Elettroforesi di DNA su gel di acrilammide	pag.59
2.12 Polymerase Chain Reaction (PCR)	pag.59
2.13 Preparazione di DNA cromosomale	pag.61
2.14 Preparazione di cellule competenti e trasformazione di <i>B. subtilis</i>	pag.61
2.15 Induzione della sporulazione in <i>B. subtilis</i> e purificazione delle spore	pag.62
2.16 Estrazione delle proteine del rivestimento sporale	pag.63
2.17 Determinazione della concentrazione proteica	pag.64
2.18 Elettroforesi di proteine su gel di acrilammide (SDS-PAGE)	pag.64
2.19 Colorazione di gel di poliacrilammide per Coomassie	pag.65
2.20 Elettrotrasferimento di proteine e <i>Western blot</i>	pag.65
2.21 <i>Dot blot</i> e analisi densitometrica	pag.66
2.22 Over-espressione e purificazione della proteina CotC in <i>E. coli</i>	pag.67
2.23 Microscopia a fluorescenza e immunofluorescenza	pag.68
2.24 Analisi sull'antigenicità, sull'immogenicità e analisi clonotipica	pag.69
3. Risultati	pag.70
Paragrafo 3.1	pag.71
3.1.1 Costruzione del vettore d'integrazione per fusioni basate su CotC	pag.75
3.1.2 Costruzione delle fusioni geniche	pag.80
3.1.3 Analisi dell'espressione eterologa nel nuovo sistema	pag.81
3.1.4 Valutazione dell'efficienza di esposizione del sistema	pag.83

Discussione	pag.88
Paragrafo 3.2	pag.91
3.2.1 Espressione dell'epitopo CD4+ in differenti sistemi di display	pag.95
3.2.2 Analisi dell'antigenicità	pag.97
3.2.3 Analisi dell'immunogenicità	pag.101
3.2.4 Analisi clonotipica sulle linee cellulari T	pag.104
Discussione	pag.106
Paragrafo 3.3	pag.111
3.3.1 Costruzione delle fusioni geniche	pag.117
3.3.2 Integrazione cromosomale delle fusioni geniche	pag.119
3.3.3 Analisi morfologica delle spore	pag.120
3.3.4 Prospettive future	pag.122
Discussione	pag.123
4. Discussione	pag.126
5. Bibliografia	pag.133

1. Introduzione

1.1 Sistemi di esposizione di antigeni eterologhi e loro applicazioni

L'esposizione di molecole eterologhe sulla superficie di microrganismi, resa possibile dalle tecniche del DNA ricombinante, sta diventando una strategia diffusamente utilizzata in diverse applicazioni di microbiologia, biotecnologia e vaccinologia.

Batteri Gram-negativi, Gram-positivi, virus e fagi vengono studiati come interessanti soggetti per queste applicazioni (Georgiou et al., 1997).

Sfruttando la tecnologia del DNA ricombinante, sulla superficie di microrganismi è possibile esprimere diversi determinanti antigenici, enzimi eterologhi, anticorpi a singola catena, brevi frammenti di istidine o anche intere librerie di peptidi (Fischetti et al., 1996).

Batteri ingegnerizzati che espongono molecole eterologhe con attività enzimatiche di interesse industriale o potenzialmente utili in campo ambientale si stanno affermando come la nuova generazione di biocatalizzatori e biosensori, rispettivamente. In questo caso, sulla superficie della cellula batterica vengono espresse, ad esempio, proteine che legano ioni metallici, incluse metallotionine ricche in cisteina (MTs) o peptidi sintetici ricchi in cisteina e istidina, in grado di legare ioni Cd^{+2} e Hg^{+2} con alta affinità.

MTs eucariotiche sono state espresse sulla superficie di cellule di *Escherichia coli* utilizzando come partner di fusione la porina LamB e

ottenendo un'efficienza di legame di ioni Cd^{+2} circa 20 volte superiore a quella del ceppo parentale (Sousa et al., 1998; 1996).

Inoltre, peptidi in grado di riconoscere e legare metalli sono stati utilizzati per l'esposizione sulla superficie di alcuni microrganismi del suolo capaci di sopravvivere anche in ambienti contaminati: una MT murina è stata espressa sulla superficie di *Pseudomonas putida* (Valls et al., 2000) e di *Ralstonia metallidurans* CH34 (Valls et al., 2000). Queste cellule ricombinanti non solo mostravano una maggiore efficienza di legame e rimozione di ioni Cd^{+2} , ma anche promuovevano e incrementavano la crescita delle piante in suoli contaminati (Valls et al., 2000). Fitochelatine sintetiche (EC_n) contenenti un motivo ripetuto ($\text{Glu-Cys}_n\text{Gly}$, responsabile del legame a ioni metallici, sono state espresse sulla superficie di cellule di *Moraxella sp.* incrementando di 10 volte il processo di accumulo di ioni Hg^{+2} a livello intracellulare (Bae et al., 2000; 2001; 2002).

Oltre ai metalli pesanti, anche contaminanti organici possono essere rimossi dall'ambiente usando cellule batteriche che espongono enzimi eterologhi. Esempi a riguardo sono le organofosforo idrolasi (OPHs), enzimi batterici capaci di degradare gli organofosfati, composti largamente utilizzati come pesticidi. Cellule ricombinanti di *E.coli* che esprimono sulla loro superficie OPH utilizzando il sistema di fusione Lpp-OmpA risultavano capaci di degradare sostanze ad azione

insetticida, come il paratione e il paraoxon, con una velocità 7 volte superiore a quella di cellule che esprimono OPH a livello intracellulare (Richins et al., 1997).

Molto attivi sono anche gli studi sulla possibilità di utilizzare batteri che esprimono in superficie anticorpi come innovative sonde cellulari utili per scopi diagnostici (Gunneriusson et al., 1996). La produzione di molecole anticorpali in sistemi procariotici offre innumerevoli vantaggi, come la rapidità di crescita (che ne permette una veloce ed economica produzione su larga scala) e la facilità di manipolazione del materiale genetico.

Sono stati costruiti frammenti ricombinanti di anticorpi a singola catena (“single-chain Fv”, scFv) che, nel sistema ospite, risultano particolarmente stabili. Il frammento anticorpale scFv murino diretto contro l’IgE dell’uomo è stato utilizzato per l’esposizione superficiale in *Staphylococcus xylosus* e in *S. carnosus* (Gunneriusson et al., 1996).

In uno studio più recente (Giomarelli et al., 2004), *Streptococcus gordonii*, un batterio commensale comunemente presente nella flora del cavo orale, è stato ingegnerizzato per l’espressione di un frammento scFv, derivato da un anticorpo monoclonale diretto contro gli antigeni I/II (SA I/II) dell’adesina di *Streptococcus mutans*, uno dei principali batteri coinvolti nella formazione di carie dentali. Cellule ricombinanti di *Streptococcus gordonii* erano in grado di legare specificamente gli

antigeni SA I/II immobilizzati, fornendo, così, un primo valido approccio alla progettazione di un sistema stabile e sicuro per l'esposizione di anticorpi ricombinanti (Giomarelli et al., 2004).

Una delle più comuni applicazioni dei sistemi di presentazione eterologa consiste nello sviluppo di vettori di vaccinazione.

In questo contesto, i sistemi di display basati su fagi o batteri hanno potenzialità tra loro differenti: mentre la tecnologia del “*phage display*” viene per lo più utilizzata per il riconoscimento di un epitopo specifico, la presentazione sulla superficie batterica di peptidi o proteine con elevato potere immunogenico permette, invece, di utilizzare i batteri ricombinanti come veicoli di vaccinazione (Benhar, 2001).

La possibilità di utilizzare la tecnica del “*phage display*” per identificare epitopi virali è stata dimostrata in uno studio (di Marzo et al., 1994) in cui peptidi del loop V3 della glicoproteina gp120 del virus HIV-I venivano inseriti nella regione N-terminale della proteina pVIII presente nel capsido virale del batteriofago filamentoso fd, ottenendo l'esposizione in copie multiple dei peptidi sulla superficie dei virioni. Gli studi sono stati condotti inizialmente sul sistema modello del batteriofago filamentoso fd e, successivamente, su sistemi basati su fagi differenti (Jiang et al., 1997; Felici et al., 1991; Felici et al., 1995; Folgori et al., 1994).

Vettori di vaccinazione basati su batteri che espongono in superficie antigeni eterologhi rappresentano oggi un sistema con forti potenzialità nel campo dell'immunoterapia. I primi studi a riguardo proponevano l'utilizzo di microrganismi Gram-positivi come sistemi di presentazione (Nguyen et al., 1993; Nguyen et al., 1995) (tabella 1).

Uno dei principali sistemi impiegati per i batteri Gram positivi è basato sul meccanismo di ancoraggio della proteina A di *Staphylococcus aureus* (SpA) (Schneewind et al., 1995).. L'estremità C-terminale di SpA consiste di una regione carica, che probabilmente interagisce con il peptidoglicano della parete cellulare, seguita da una regione, in comune a diversi recettori di superficie di batteri Gram positivo, contenente un motivo LPXTG, una regione idrofobia e una piccola coda carica. Il meccanismo di ancoraggio implica un taglio proteolitico all'interno della sequenza amminoacidica LPTXG, tra i residui di treonina e glicina, seguito da legame covalente del recettore di superficie alla parete cellulare.

Successivamente, anche i batteri Gram-negativi, come *E.coli* e *Salmonella* spp, sono stati utilizzati per le stesse applicazioni (Wu et al., 1989) (tabella 2). Ricerche su *Salmonella* hanno chiaramente dimostrato che ceppi attenuati possono essere efficientemente utilizzati come veicoli per la presentazione di determinanti di virulenza antifagocitici derivanti da specie batteriche non correlate (Poirier et al., 1988).

Tabella 1. Esempi di sistemi di esposizione eterologa in batteri Gram positivi

Carrier protein	Passenger protein	Applications	References
N-terminal fusions			
<i>Escherichia coli</i> PAL (173aa)	Anti-atrazine antibody fragment (252aa)	Biosensor	Dhillon <i>et al.</i> 1999
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> IgA1 protease (45 kDa)	Cholera toxin B subunit (CtxB) (13kDa)	Vaccines	Jose <i>et al.</i> 1995
<i>E. coli</i> adhesin (AIDA-I) (51,5kDa)	Cholera toxin B subunit (CtxB) (13kDa)	Vaccines	Jose <i>et al.</i> 2002
C-terminal fusions			
<i>E. coli</i> Lpp-OmpA (123aa)	Organophosphorus hydrolase (365aa) Pytochelains (40aa)	Biodegradation Adsorption (bioaccumulation)	Richins <i>et al.</i> 1997 Bae <i>et al.</i> 2000 Jung <i>et al.</i> 1998
<i>Pseudomonas syringae</i> INP (36kDa)	Carboxymethylcellulase (CMCase) (33kDa) Levansucrase (424aa) Epatitis B virus surface antigen (HbsAg) (168aa)	Whole-cell biocatalyst Utilization of levan Vaccines, antibody production	Jung <i>et al.</i> 1998 Lee <i>et al.</i> 2000
Sandwich fusions			
<i>E. coli</i> OmpC (367aa)	Poly-His peptides (162aa)		Xu and Lee 1999
<i>E. coli</i> LamB (446aa)	Human metallothionein (HMT) (66aa) Yeast metallothionein (YMT)	Heavy metal removal	Sousa <i>et al.</i> 1998 Martineau <i>et al.</i> 1991
<i>E. coli</i> FimH (30kDa)	Epatitis B virus surface antigen (HbsAg) (168aa) Random Peptide library (33aa)	Heavy metal removal Vaccines, antibody production	Kjaergaard <i>et al.</i> 2001
<i>E. coli</i> FimA (180aa)		Screening of binding motif	Stentebjerg-Olesen <i>et al.</i> 1997
<i>Caulobacter crescentus</i> RsaA (1073aa)	Cholera toxin B epitopes (CtxB)	Vaccines	Bingle <i>et al.</i> 1997
	Fragment from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> K pilin (12aa)	Not indicated	

Tabella 2. Esempi di sistemi di esposizione eterologa in batteri Gram positivi

Carrier protein	Passenger protein	Applications	References
N-terminal fusions			
Staphylococcal protein A (SpA) (472aa)	Variants of human respiratory sincitial virus (RSV) glycoprotein fragment	Live vaccines	Nguyen <i>et al.</i> 1995
	Cholera toxin B subunit (CtxB) (103aa)	Live vaccines	Liljeqvist <i>et al.</i> 1997
	<i>Bacillus subtilis</i> CotB (275aa)	Tetanus toxin fragment C (TTF-C) (50Kda)	Protects against tetanus toxin
C-terminal fusions			
<i>Bacillus anthracis</i> S-layer protein EA1 (209aa)	Tetanus toxin fragment C (TTF-C) (50Kda)	Protects against tetanus toxin	Mesnage <i>et al.</i> 1999
<i>Streptococcus pyogenes</i> M6 (262aa)	V3 domains of HIV-1 gp120	Vaccines	
<i>Bacillus subtilis</i> CotB (275aa)	<i>Brucella abortus</i> antigen L7/L12	Protects against tetanus toxin	Oggioni <i>et al.</i> 1999
<i>Bacillus subtilis</i> CotC (66aa)	Tetanus toxin fragment C (TTF-C) (50Kda)	Adjuvant effect in vaccine formulations	Dieye <i>et al.</i> 2001
	<i>E. coli</i> Labile Toxin B subunit (eLTB) (459aa)	Protects against tetanus toxin	Isticato <i>et al.</i> 2001
	Tetanus toxin fragment C (TTF-C) (50Kda)		Mauriello <i>et al.</i> 2003
Sandwich fusions			
<i>Bacillus subtilis</i> CotB (275aa)	Tetanus toxin fragment C (TTF-C) (50Kda)	Protects against tetanus toxin	Mauriello <i>et al.</i> 2003
			Isticato <i>et al.</i> 2001

Per evitare l'uso di vaccini ricombinanti basati su microrganismi patogeni sono stati sviluppati anche sistemi di espressione di antigeni eterologhi basati su batteri non patogeni commensali o comunemente usati come integratori alimentari, come, rispettivamente, *S. gordinii* e diversi stafilococchi o batteri acido-lattici, (Fischetti et al., 1996; Pozzi and Wells, 1997; Stahl et al., 1997, Mercenier et al., 1999). Queste specie batteriche, che non invadono l'organismo ospite, potrebbero però essere incapaci di generare una forte risposta immunitaria. Tuttavia, in fase di sviluppo vi è anche una “seconda generazione” di vaccini ottenuti esprimendo sulla superficie cellulare, in aggiunta all'antigene di interesse, molecole di adesina che indirizzino i batteri ricombinanti alle cellule dell'epitelio mucosale (Cano et al, 1999; Liljeqvist et al., 1999). In questo modo l'antigene viene correttamente veicolato ai siti immunoreattivi delle mucose, le quali rappresentano la principale via di penetrazione di svariati microrganismi patogeni, migliorando, così, la risposta immunitaria (Samuelson et al., 2002).

Recentemente è stata messa a punto una strategia per ingegnerizzare spore di *Bacillus subtilis* per la presentazione di antigeni eterologhi sulla superficie sporale (Isticato et al., 2001). Il sistema di display basato sulla spora presenta numerosi vantaggi rispetto ai sistemi basati sull'uso di fagi o batteri. Le spore sono forme cellulari metabolicamente quiescenti e presentano molte caratteristiche vantaggiose quali l'economicità, la

semplicità di produzione e purificazione, la non patogenicità e la stabilità. Spore di *B. subtilis*, *B. clausii*, *B. coagulans*, *B. cereus* e *B. natto* sono comunemente utilizzate per uso umano ed animale, sia come integratori alimentari sia per il trattamento di disordini gastrointestinali (tabella 3). Tale diffuso impiego rappresenta la più convincente prova della non patogenicità delle spore di queste specie batteriche. Inoltre, la disponibilità commerciale di prodotti basati su spore batteriche dimostra la possibilità di produrre in larga quantità ed a bassi costi spore purificate. *B. subtilis* presenta l'ulteriore vantaggio di essere molto conosciuto a livello genetico e biochimico, cosa che ovviamente ne facilita la manipolazione in laboratorio e che ha incentivato una serie di studi volti alla progettazione di vaccini basati sulla spora di *B. subtilis* come vettore di esposizione dell'antigene. Grazie alle proprietà fisiche e biologiche della spora, vaccini basati su preparazioni purificate di spore presentano un buon livello di sicurezza per l'uomo quando somministrati oralmente, in più sono estremamente resistenti all'ambiente acido del tratto gastro-intestinale (Oggioni et al., 2003).

Tutte queste caratteristiche insieme hanno suscitato l'interesse della comunità scientifica sulla spora di *B. subtilis* e sulle sue valide potenzialità come sistema di esposizione di antigeni eterologhi.

Tabella 3: Prodotti commerciali per uso umano contenenti spore di *Bacillus*

Prodotto	Produttore	Commenti
Bactisubtil®	Aventis (Portogallo) Marion Merrell, LDA	Capsule contenenti 1×10^9 spore di <i>Bacillus cereus</i> IP 5832 (Hoa, et al., 2000; Mazza, 1994)
Lactipan Plus	Istituto Biochimico Italiano SpA, Milan, Italy	Capsule contenenti 2×10^9 spore di <i>Bacillus subtilis</i> (riportato sulla confezione come <i>Lactobacillus sporogenes</i>) (Hoa, et al., 2000)
Enterogermina	Sanofi Winthrop Milano, Italia	Fiale contenenti 1×10^7 spore of <i>B. clausii</i> in sospensione. Contiene almeno quattro ceppi diversi di <i>B. clausii</i> (fino al 2001 riportato sulla confezione come <i>B. subtilis</i>) (Green, et al., 1999; Hoa, et al., 2000; Senesi, et al., 2001).
Domuvar	BioProgress Anagni, Italia	Fiale contenenti 1×10^9 spore di <i>Bacillus clausii</i> in sospensione (riportato sulla confezione come <i>B. subtilis</i>). (Hoa, et al., 2000). Non più in commercio.
Biosubtyl	Biophar Company Dalat, Vietnam	Sacchetto (1 g) contenente 10^6 - 10^7 spore di <i>B. cereus</i> (riportato sulla confezione come <i>B. subtilis</i>). (Hoa, et al., 2000)
Biosubtyl	Biophar Company Nha Trang, Vietnam	Sacchetto (1 g) contenente 10^6 - 10^7 spore di <i>B. pumilus</i> (riportato sulla confezione come <i>B. subtilis</i>). (Green, et al., 1999; Hoa, et al., 2000)
Subtyl	Mekophar, Pharmaceutical Factory No. 24, Ho Chi Minh City, Vietnam	Capsule contenenti 10^6 - 10^7 spore di <i>B. cereus var vietnami</i> (riportato sulla confezione come <i>B. subtilis</i>). (Hoa, et al., 2000).
Bibactyl	Tendiphar Corporation Ho Chi Minh City, Vietnam	Sacchetto (1 g) contenente 10^7 - 10^8 spore di <i>B. subtilis</i> .
Biscan®	Binex Co. Ltd Busan, S. Korea	Capsule contenenti 1.7×10^7 spore di <i>B. polyfermenticus</i>

(da Bacterial Spore Formers: Probiotics and Emerging Applications. Horizon Bioscience Press, UK)

1.2 La spora

Le spore sono cellule metabolicamente inattive prodotte da una varietà di specie batteriche in risposta a condizioni ambientali sfavorevoli per la crescita. I batteri che formano spore possiedono complessi programmi di sviluppo che portano ad un adattamento all'ambiente e al differenziamento cellulare con la formazione di spore (Piggot et al., 2004). Tuttavia, bisogna distinguere due tipi di spore: le esospore e le endospore.

Le esospore sono prodotte dalla settazione e frammentazione di ife di diverse specie appartenenti al genere *Actinomyces*. Queste spore mancano di strutture specializzate tipiche delle endospore, come la corteccia e il rivestimento sporale, e ciò le rende meno resistenti a condizioni ambientali ostili. Tuttavia, il loro significato evolutivo non è quello di resistere a condizioni di stress ambientale ma quello di diffondere la specie.

Le endospore, invece, sono prodotte sia da batteri Gram positivi, da specie appartenenti ai generi *Bacillus*, *Clostridium*, *Desulfotomaculum*, *Thermactinomyces*, *Sporolactobacillus* e cocci del genere *Sporosarcina*, sia da batteri Gram negativi, che includono *Sporomusa acidovorans*, *Sporomusa malonica*, *Sporomusa termitida*, *Acetonema longum* e *Coxiella burnetii*.

L'endospora viene prodotta all'interno della cellula vegetativa in una struttura compartimentalizzata chiamata prespora. Essa può trovarsi in uno stato di dormienza per un tempo molto lungo durante il quale può resistere a diversi fattori ostili come, per esempio, l'alta temperatura (sopravvive a temperature prolungate di 60°-80°C che sono fatali per la maggior parte delle cellule vegetative), pH estremi, vari agenti chimici, antibiotici, radiazioni ed essiccazione. Al ripristinarsi di condizioni ambientali favorevoli, le endospore possono germinare e formare una nuova cellula vegetativa, passando, così, da uno stato di criptobiosi (ossia di vita latente) ad uno metabolicamente attivo (Moir et al., 2003).

Data la loro particolare resistenza a qualsiasi stress ambientale, le spore possono colonizzare ogni habitat: spore di *Bacillus* sono state ritrovate un po' ovunque, dai poli ai tropici, dagli oceani agli ambienti d'acqua dolce, dalla superficie terrestre al sottosuolo e persino nell'atmosfera (Nicholson, 2004).

La possibilità di formare spore rappresenta, quindi, un enorme vantaggio per la cellula batterica.

Il processo di sviluppo di una spora, detto *sporulazione*, e la sua complessa struttura sono da molti anni oggetto di intensi studi nell'organismo modello *Bacillus subtilis*, il primo tra tutti i batteri sporigeni per cui viene riportata la sequenza genomica (Knust et al., 1997).

1.2.1 Organizzazione strutturale della spora

L'organizzazione strutturale di base di una spora batterica può essere descritta in termini di diversi strati concentrici o di strutture. La parte centrale della spora, il *core*, è delimitata dalla membrana interna della prespora e contiene una copia del cromosoma batterico (Piggot et al., 1976; Driks, 1999; Henriques et al., 2000) (fig. 1).

Durante gli stadi intermedi del processo di sporulazione, un sottile strato di peptidoglicano simile in composizione a quello presente nella parete della cellula vegetativa, si forma al di sopra della membrana interna della prespora. Questo strato fungerà da parete per la cellula che si origina dalla germinazione della spora. Nello spazio compreso tra le membrane interna ed esterna della prespora si trova un altro sottile strato di peptidoglicano, chiamato corteccia o *cortex* (fig. 1).

Il peptidoglicano presente nel *cortex* è chimicamente distinto da quello presente nella cellula vegetativa e viene formato principalmente da precursori ed enzimi che sono prodotti nella cellula madre e traslocati successivamente ai rispettivi siti di polimerizzazione attraverso la membrana esterna della prespora.

La formazione del *cortex* è fondamentale per lo sviluppo ed il mantenimento della capacità di resistenza al calore della spora.

Il *cortex* è circondato da un'altra struttura pluristratificata di natura proteica chiamata tunica sporale o *coat*, il cui ruolo principale è quello di

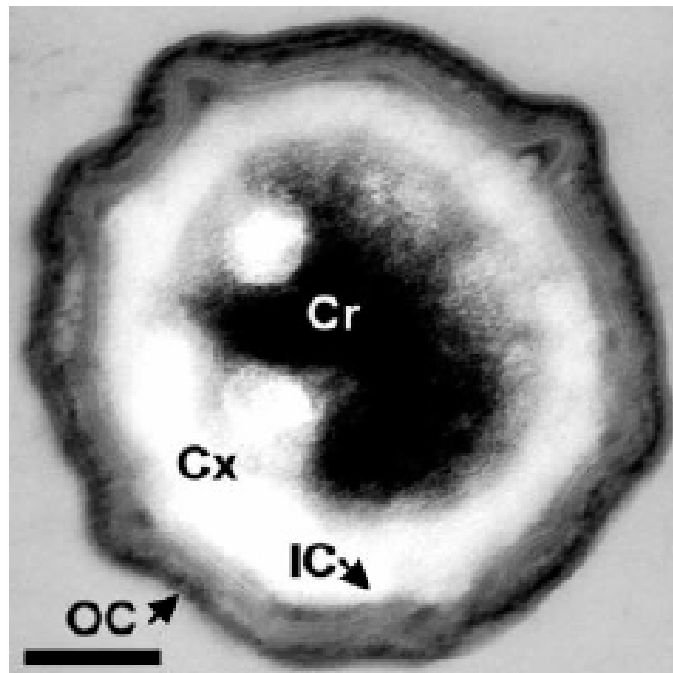


Figura 1: fotografia al microscopio elettronico di una spora di *Bacillus subtilis*. **Cr** indica il core della spora; **Cx** la corteccia; **IC** e **OC** lo strato interno ed esterno della tunica, rispettivamente (Silvaggi et al., 2004).

proteggere il *cortex* dall'azione di solventi tossici, da specie reattive all'ossigeno o da radiazioni UV e di garantire un'appropriata risposta della spora a segnali provenienti dall'ambiente esterno, come la presenza di nutrienti o di altri fattori che ne promuovono la germinazione (Setlow, 2003). Analisi per microscopia a trasmissione elettronica (TEM, *Transmission Electron Microscopy*) effettuate su sezioni sottili di spore di *B. subtilis* hanno rivelato la presenza di due strati principali all'interno della tunica sporale. Uno strato più interno è formato dalla sovrapposizione di strutture lamellari che possono variare in numero da 3 a 6, allineate lungo la superficie della spora, ed uno strato più esterno che consiste di 4 o 5 strutture striate dense agli elettroni disposte anch'esse parallelamente alla superficie sporale (Driks et al., 1999; Henriques et al., 2000).

Entrambi questi strati della tunica appaiono strettamente associati e presentano uno spessore maggiore ai poli della spora (in queste regioni, lo strato interno e lo strato esterno della tunica hanno, rispettivamente, una larghezza di 20-30 nm e di 40-90 nm), mentre appaiono meno spessi lungo i bordi (Driks et al., 1999; Henriques et al., 2000).

Non è ancora chiaro quali siano i fattori che determinano l'aspetto striato o lamellare degli strati interno ed esterno della tunica. Esso può essere dovuto in parte alla successiva sovrapposizione di altre proteine sulle

proteine del *coat* durante il processo di assemblaggio (Jenkinson et al., 1981), così come alle proprietà fisiche dei componenti del *coat*.

La distinzione morfologica tra strato interno ed esterno della tunica ha basi genetiche: spore di un ceppo mutato nel gene *cotE* mostrano una tunica interna correttamente assemblata ma sono prive, invece, dello strato esterno della tunica (fig.2) (Zheng et al., 1988).

Lo spazio compreso tra il *cortex* e lo strato interno della tunica è occupato da materiale amorfo che funge da “collante” tra le due strutture di rivestimento. Infatti in mutanti, come *cotE* e *tasA*, in cui la tunica non viene assemblata, questo strato amorfo non aderisce perfettamente alla corteccia sottostante (Aronson et al., 1992; Costa et al., 2006; Serrano et al., 1999). La composizione di questo strato non è ancora nota ma comprende sicuramente materiale di natura elastica poiché la circonferenza della tunica interna nelle spore dei mutanti appare più grande rispetto a quella di una spora *wild-type*.

Anche se la proteina CotE svolge un ruolo cruciale nella morfogenesi del *coat* e nell’assemblaggio di alcune proteine presenti nello strato interno della tunica (Westphal et al., 2003), si è visto che tra le proteine estratte dalle spore del mutante *cotE* non vi sono principalmente quelle associate allo strato esterno della tunica (Costa et al., 2004). Alcuni dei componenti proteici più abbondanti del *coat*, come CotA, CotB, CotG e CotC, sono assenti negli estratti proteici del mutante *cotE* e sono quelli

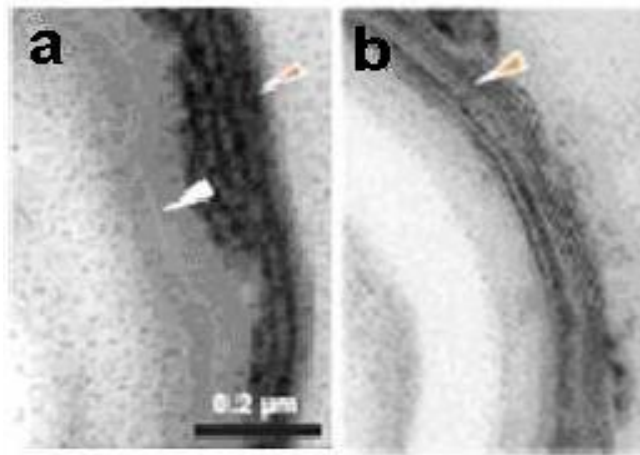


Figura 2. Fotografia al microscopio a trasmissione elettronica di sezioni sottili di spore di un ceppo *wt* (pannello A) e un ceppo *cotE* (pannello B). Le frecce bianche e rosse indicano la tunica interna e la tunica esterna rispettivamente.

associati alla tunica esterna. CotB, CotC e CotG, in particolare, sono stati selezionati e utilizzati con successo come partner di fusione per l'esposizione di antigeni eterologhi sulla superficie della spora (Isticato et al., 2001; Mauriello et al., 2004; Kim et al., 2005; Kwon et al., 2007).

In diverse specie di *Bacillus*, il *core* è avvolto da un ulteriore rivestimento, l'esosporio. In spore di *B. cereus* o *B. anthracis*, per esempio, questa struttura appare nettamente separata dalla tunica esterna ed è formata da uno strato basale paracristallino a cui è associato uno strato costituito da un film continuo di proteine glicosilate (Henriques et al., 2007). Nonostante i molti studi che sostengono la presenza in spore di *B. subtilis* di una struttura simile e dell'espressione nella cellula madre di diversi geni codificanti per putative glicosilasi, le spore di *B. subtilis* apparentemente non presentano uno strato di esosporio nettamente distinto, oppure, questo rivestimento potrebbe essere lo strato estremamente sottile e strettamente associato alla tunica che viene visualizzato con analisi TEM o al microscopio a forza atomica (AFM, *Atomic Force Microscopy*) (Chada et al., 2003).

Al contrario delle spore di *B. cereus*, inoltre, *B. subtilis* forma spore prive di particolari appendici (Henriques et al., 2007).

Le strutture di rivestimento sporale, la tunica e l'esosporio, contribuiscono in maniera significativa a preservare le proprietà di

resistenza della spora a stress di natura sia chimica che fisica e persino alla simulazione di condizioni extra-terrestri (Nicholson, 2004).

Anche se il *core* della spora è metabolicamente inattivo, la spora interagisce attivamente con l'ambiente esterno (Henriques et al., 2004; Driks, 1999; Henriques et al., 2000; Nicholson et al., 2000; Zheng et al., 1988). Queste interazioni sembrano essere modulate principalmente dalla tunica e dall'esosporio e probabilmente sono causate sia da fattori genetici che da fattori biochimici. Innanzitutto, la superficie delle spore è una struttura flessibile in grado di contrarsi o di espandersi in risposta a diversi parametri ambientali, come l'umidità (Driks, 2003), poi, sia la tunica sia l'esosporio presentano una varietà di enzimi che migliorano la protezione della spora dall'aggressione di agenti esterni, influenzano il processo di germinazione e, molto probabilmente, influenzano anche il comportamento degli organismi che interagiscono con la spora (Driks, 1999; Nicholson et al., 2004).

Esistono numerose variazioni interspecie o intraspecie nella struttura e nella composizione delle superfici di rivestimento sporale che, probabilmente, riflettono le condizioni ambientali in cui le spore vengono a formarsi e persistono (Melly et al., 2002).

Studi sul processo di assemblaggio dell'esosporio attualmente vengono effettuati su organismi patogeni, come *B. cereus* e *B. anthracis*, mentre,

la struttura, la composizione e l'assemblaggio della tunica sporale vengono ampiamente analizzati nell'organismo modello *B. subtilis*.

1.2.2 I componenti proteici della tunica sporale.

La tunica sporale è composta principalmente da proteine (circa il 30 % delle proteine totali della spora) (Driks, 1999). Il numero totale di proteine è di oltre 70 (Kim et al., 2006) (tabella 4).

Oltre agli enzimi della tunica, molte proteine della tunica sporale di *B. subtilis* sono specie-specifiche o hanno ortologhi solo in altri batteri sporigeni (tabella 4). Le proteine della tunica possono essere estratte da spore purificate tramite trattamento alcalino o con agenti riducenti in presenza di detergenti.



In *B. subtilis*, i metodi di estrazione proteica permettono di solubilizzare i componenti degli strati interni ed esterni della tunica, ma non del *cortex*, producendo una collezione di circa 40 polipeptidi di peso molecolare variabile da 6 a 70 KDa (tab.5) (Henriques et al., 2000). Circa il 6 % del materiale solubilizzato è di natura carboidratica e almeno due proteine sono glicosilate (Jenkinson et al., 1981). Le proteine resistenti all'estrazione (circa il 30 % delle proteine totali della tunica) costituiscono una frazione insolubile che contiene materiale tenuto insieme da legami crociati, incluso componenti ricchi in cisteina codificati dal cluster *cotVWXYZ* (Zhang et al., 1993).

Tabella 4. Proteine della superficie sporale di *Bacillus subtilis*.

Protein	Accession number	Orthologues															
		B.s.	B.li.	B.a.	B.c.	B.t.	B.cl.	B.h.	G.k.	O.i.	C.p.	C.a.	C.t.	C.th.	C.n.	C.c.	C.d.
CotI (YtaA)	BG113821	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotJC	BG11801	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotS	BG11380	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotSA	BG11381	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CwlJ	BG11172	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SodA	BG11676	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SpoIVA	BG10275	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YaaH	BG10080	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YabG	BG10106	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YckK	BG11340	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YcsK (LipC)	BG11232	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YhaX	BG13000	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YirY	BG13088	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YbaQ	BG10124	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YdhD	BG12181	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YhbA	BG12236	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YusA	BG14013	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YutH	BG14044	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YsxE	BG10347	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotF	BG10012	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YisY	BG13104	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotM	BG11822	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YkuD	BG13288	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YkvP	BG13318	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tgl	BG10946	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotA	BG10490	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotD	BG10493	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotE	BG10494	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotN (YqfT)	BG11666	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotO (YjbX)	BG13153	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
GerQ	BG10608	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SafA	BG13781	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SpoVM	BG10776	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SpoVID	BG10346	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
TasA	BG11697	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YlbD	BG13367	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YppG	BG11448	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YpeP	BG11609	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YpzA	BG13764	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YheD	BG13036	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YhjR	BG13084	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotV	BG10496	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotW	BG10497	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotX	BG10500	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotY	BG10498	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotZ	BG10499	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YodI	BG13537	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotH	BG11791	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotJA	BG11799	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotJB	BG11800	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotP	BG12167	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotQ (YvdP)	BG12424	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotB	BG10491	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YxeE	BG11881	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotC	BG10492	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotG	BG11017	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotR (YvdO)	BG12423	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotT	BG10495	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CotU	BG13471	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OxdD	BG13484	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YeeK	BG12825	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YmaG	BG13415	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YjdH	BG13180	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YknT (Cse15)	BG12251	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YopQ	BG13650	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YsnD	BG12335	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YtxO	BG11382	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YuzC	BG14052	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
YwqH	BG12512	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Yybl	BG10022	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(Henriques, 2007). Gli ortologhi sono stati identificati con una ricerca BLAST (www.ncbi.nih.gov) usando le sequenze indicate contro i genomi seguenti:

B.a., *Bacillus anthracis* Sterne
B.c., *B. cereus* ATCC 10987
B.cl., *B. clausii* KSM-K16
B.h., *B. halodurans* C-125
B.l., *B. licheniformis* ATCC 14580
B.s., *B. subtilis* 168
B.t., *B. thuringiensis* serovar konkukian str. 97-27
C.a., *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824
C.c., *Clostridium cellulolyticum* H10
C.d., *Clostridium difficile* QCD-32g58
C.n., *Clostridium novyi* NT
C.p., *Clostridium perfringens* ATCC 13124
C.t., *Clostridium tetani* E88 (asporogeneous)
C.th., *Clostridium thermocellum* ATCC 27405
G.k., *Geobacillus kaustophilus* HTA426
O.i., *Oceanobacillus iheyensis* HTE831

 Morphogenetic factors } coinvolti nell'assemblaggio della tunica sporale
 Enzymes




 Protein present
 Protein absent
 Protein not detected

Tabella 5. I geni *cot* e i geni morfogenetici di *Bacillus subtilis*.

Gene	Dimensioni prodotto (KDa)	Controllo genetico ^a	Posizione sulla mappa (gradi)	Strato tunica ^b	Ruolo morfogenetico ^b	Commenti
<i>cotA</i>	65	σ^k	52	OC	ignoto	controlla il pigmento bruno
<i>cotB</i>	59	$\sigma^k + \text{GerE}$	314	OC	ignoto	
<i>cotC</i>	12	$\sigma^k + \text{GerE}$	168	OC	ignoto	
<i>cotD</i>	11	σ^k	198	OC	ignoto	
<i>cotE</i>	24	$\sigma^E, \sigma^E + \text{SpoIIID}$	150	OC	assemblaggio OC	
<i>cotF</i>	5,8	σ^k	356	?	ignoto	processata per proteolisi
<i>cotG</i>	24	$\sigma^k + \text{GerE}$	314	OC	assemblaggio <i>CotB</i>	9 copie ripetute di 13aa
<i>cotH</i>	42,8	σ^k	314	IC	assemblaggio OC	vicino <i>cotB</i> e <i>cotG</i>
<i>cotJA</i>	9,7	σ^E	62	Matrice	ignoto	interagisce con <i>CotIC</i>
<i>cotJC</i>	21,7	σ^E	62	Matrice	ignoto	interagisce con <i>CotJA</i>
<i>cotK</i>	6	?	164	?	ignoto	putativa <i>coat protein</i>
<i>cotL</i>	5,4	?	164	?	ignoto	putativa <i>coat protein</i>
<i>cotM</i>	14	σ^k	164	OC	assemblaggio OC	α -Crystallin-like
<i>cotS</i>	41	$\sigma^k + \text{GerE}$	270	IC	ignoto	<i>CotE</i> -dipendente
<i>cotT</i>	7,8	σ^k	108	IC	assemblaggio IC	processata per proteolisi
<i>cotV</i>	14	$\sigma^k, \sigma^k + \text{GerE}$	107	?	ignoto	putativa <i>coat protein</i>
<i>cotW</i>	12	$\sigma^k, \sigma^k + \text{GerE}$	107	?	ignoto	putativa <i>coat protein</i>
<i>cotX</i>	18,6	$\sigma^k, \sigma^k + \text{GerE}$	107	OC	assemblaggio OC	frazione insolubile
<i>cotY</i>	17,9	$\sigma^k, \sigma^k + \text{GerE}$	107	OC	assemblaggio OC (?)	frazione insolubile
<i>cotZ</i>	16,5	$\sigma^k, \sigma^k + \text{GerE}$	107	OC	assemblaggio OC (?)	frazione insolubile
<i>spoIVA</i>	55	σ^E	204	NCP	attacco pretunica alla prespora	
<i>spoIVD</i>	65	σ^E	244	NCP	coinvolto nell'attacco della tunica	
<i>sodA</i>	25	?	221	NCP	coinvolto nell'attacco della tunica	

Driks, 1999

^a Sono riportati solo i fattori σ e i principali regolatori positivi.

^b IC, strato interno della tunica; OC, strato esterno della tunica; NCP, non considerata come *coat protein*.

Un'importante serie di modifiche sono i *crosslinks* che contribuiscono alla resistenza della tunica sporale. Molti tipi di *crosslink* sono implicati nell'assemblaggio della tunica sporale, e includono ponti disolfuro e ponti di tirosina. L'importanza di questi ultimi tipi di legame per l'integrità della tunica sporale è rafforzata dal fatto che molte proteine della tunica contengono nella loro sequenza un'alta percentuale di residui di tirosina e legami tirosina-tirosina sono stati trovati nella tunica di *B. subtilis*. Studi recenti hanno identificato un'attività transglutaminasica associata alla tunica, identificata nell'enzima Tgl, che catalizza la formazione di legami crociati del tipo ϵ - γ -glutamyl-lisina tra i gruppi R di aminoacidi diversi appartenenti alla stessa catena o a catene aminoacidiche diverse (Kobayashi et al., 1996; Suzuki et al., 2000). I legami crociati indotti dalla transglutaminasi sono generalmente stabili, resistenti all'azione di proteasi e conferiscono rigidità e resistenza di tipo fisico, meccanico e chimico a diversi tessuti o strutture cellulari. Le proteine *Tgl-like* identificate nella specie *Bacillus* e solo in alcuni altri batteri sporigeni non sono correlate alle altre transglutaminasi eucariotiche o procariotiche (Zilhao et al., 2005).

È stato dimostrato che esistono almeno 20 proteine della tunica che hanno attività enzimatica (tabella 4). Alcune di queste influenzano il processo di assemblaggio attraverso modifiche post-traduzionali su proteine di rivestimento (esempi sono gli enzimi Tgl e la proteasi YabG)

(Henriques et al., 1998; Ragkousi et al., 2004), mentre altre regolano il processo di germinazione (Ragkousi et al., 2003) o sono deputate alla protezione della spora (Martins et al., 2002).

1.2.3 Assemblaggio dei componenti della tunica sporale.

Recentemente è stato proposto un modello che spiega come la struttura stratificata della tunica sporale venga stabilizzata e come la sua formazione avvenga sulla superficie della spora (fig. 3) (Driks, 1994). Secondo questo modello, l'assemblaggio della tunica sporale è diviso in quattro fasi : 1) legame di SpoIVA alla superficie della prespora; 2) formazione della pretunica sporale; 3) assemblaggio dello strato interno ed esterno; 4) assemblaggio dello strato interno ed esterno incluse le modifiche post-assemblaggio della tunica.

L'assemblaggio della tunica sporale inizia subito dopo la divisione asimmetrica che porta alla formazione della cellula madre e della prespora.

Subito dopo la formazione del setto di sporulazione, CotE forma uno strato posizionato lungo il setto asimmetrico dal lato della cellula madre, e, dopo che la prespora acquisisce la forma di un protoplasto libero nella cellula madre, lo strato di CotE circonda la prespora, rimanendo separato da essa da uno spazio di circa 75 nm (Driks et al., 1994; Webb et al., 1995). Una matrice (*scaffold*) occupa questo spazio e connette lo strato

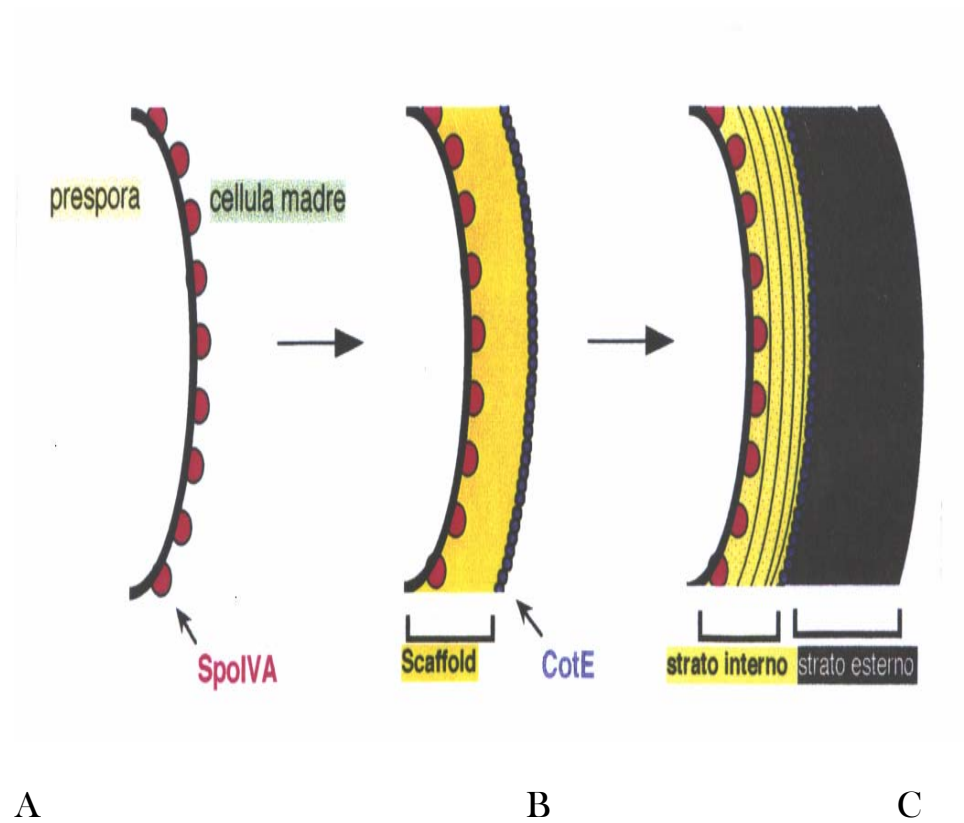


Figura 3.: Modello per l'assemblaggio della tunica sporale di *B. subtilis*. (A). SpoIVA si assembla intorno alla superficie esterna della prespora. (B) CotE determina la formazione di una matrice sullo strato basale di SpoIVA. (C). I componenti che formeranno lo strato interno della tunica si infiltreranno tra le molecole di CotE, mentre i componenti che formeranno lo strato esterno si depositeranno sulla superficie della matrice.

di CotE alla superficie della prespora. L'insieme dello strato di CotE e della matrice viene detto pretunica e si assembla presto sulla superficie della spora durante la sporulazione. L'evento successivo nella formazione della tunica sporale è l'assemblaggio dello strato interno e dello strato esterno. Presumibilmente, le proteine dello strato interno si inseriscono nello spazio compreso tra lo strato di CotE e la superficie della prespora formando lo strato interno lamellare (Driks et al., 1994). Le proteine dello strato esterno, invece, si assemblano simultaneamente intorno allo strato di CotE a formare lo strato esterno elettrondenso. Il ruolo principale della pretunica, quindi, è quello di stabilizzare i due principali strati della tunica sporale.

SpoIVA è un'altra proteina ad attività morfogenetica. Spore mutanti nel gene *spoIVA* presentano una tunica sporale correttamente assemblata ma che non circonda la prespora (Roels et al., 1992; Stevens et al., 1992). Il ruolo di SpoIVA, quindi, è quello di attaccare in qualche modo la pretunica alla superficie della prespora dal lato della cellula madre nelle fasi precoci della sporulazione (Driks et al., 1994).

SpoVID (Beall et al., 1993), come SpoIVA, è anch'essa implicata nell'attacco della tunica sporale alla prespora dal momento che spore mutate in *spoVID* hanno una tunica sporale dispersa nel citoplasma, anche se la pretunica è attaccata alla prespora. Quindi SpoVID agisce in modo simile a SpoIVA ma in un momento successivo del processo di

sporulazione, quando SpoIVA non è più attiva (Driks et al., 1994) (fig.4). Un ruolo importante nell'assemblaggio dello strato esterno della tunica è infine svolto da una proteina di 42 kDa corrispondente a CotH. Spore di ceppi mutati in *cotH* hanno piccoli difetti di germinazione e profonde alterazioni nel profilo delle proteine Cot (Naclerio et al., 1996), mancando di alcuni dei componenti più abbondanti, come CotB, CotC e CotG. Studi recenti hanno dimostrato che CotH potrebbe svolgere un ruolo di *chaperone* in grado stabilizzare le proteine CotG e CotC, mediante un'interazione diretta o ad opera di una nuova proteina morfogenetica della tunica sporale dipendente da CotH (Baccigalupi et al., 2004; Isticato et al., 2004). Dal momento che l'assemblaggio di CotB dipende, a sua volta, dall'espressione di *cotG*, è stato proposto un controllo gerarchico CotH-CotG-CotB (Zilhao et al., 2004).

Ci sono anche altre proteine morfogenetiche, come CotM, una proteina dello strato esterno della tunica sporale. Spore di ceppi mutati in *cotM* hanno una ridotta quantità di proteine dello strato esterno come CotC e uno strato esterno non bene assemblato. CotM è implicata maggiormente nella formazione dello strato esterno e molto probabilmente contribuisce alla formazione di una struttura insolubile necessaria per conferire robustezza allo strato esterno.

1.3 La spora come sistema di esposizione di antigeni eterologhi

Le strategie di *display* di molecole eterologhe messe a punto sinora si basano sull'utilizzo di diversi batteri Gram positivi e Gram negativi come vettori di presentazione (Lee et al., 2003). I sistemi di *display* studiati tuttoggi propongono di utilizzare, come motivo di ancoraggio per l'esposizione di molecole eterologhe, proteine presenti sulla membrana esterna oppure lipoproteine o subunità di appendici della superficie cellulare e proteine *S-layer*, in batteri Gram negativi, mentre, per ottenere l'esposizione superficiale in batteri Gram positivi, vengono per lo più utilizzate proteine di membrana (fig. 4A).

La strategia che si segue per ottenere l'espressione eterologa in ciascuno di questi sistemi coinvolge una proteina *carrier*, che, generalmente, appartiene all'involucro più superficiale della cellula e una proteina eterologa da esporre, la cosiddetta proteina *passenger*. Diverse sono le proprietà della proteina *carrier* che possono influenzare l'efficienza del *display* superficiale e che possono produrre differenti effetti sulla stabilità e sull'integrità del sistema ospite. Affinchè una proteina possa essere valutata come un buon *carrier* è necessario che abbia determinate caratteristiche: i) deve contenere una sequenza segnale che permetta il trasporto della proteina di fusione attraverso la membrana, ii) deve contenere un “forte” motivo di ancoraggio alla superficie cellulare, per evitare il distacco dalla superficie cellulare e iii) deve essere resistente

all'azione di proteasi presenti o nell'ambiente extra-cellulare o nello spazio periplasmico.

Il posizionamento della proteina eterologa nella sequenza amminoacidica del *carrier* è un altro fattore importante poiché esso va a influenzare la stabilità, l'attività e le eventuali modifiche post-traduzionali della proteina di fusione. Per tale motivo, diversi sono gli approcci seguiti per costruire una fusione genica che sfruttano o la regione N-terminale o la regione C-terminale o, ancora, la sequenza interna del *carrier*, in modo da costruire la cosiddetta fusione *sandwich*.

Un altro fattore importante da considerare quando si vuole costruire una fusione genica è quello che riguarda il processo di traslocazione della proteina ricombinante attraverso la superficie cellulare, necessario ai fini di una corretta esposizione della proteina di fusione stessa. Dagli studi effettuati a riguardo sino ad oggi emerge che i batteri Gram positivi sono potenzialmente migliori “candidati”, rispetto ai batteri Gram negativi, per ottenere l'esposizione superficiale. Nel sistema Gram positivo il vantaggio consiste nel fatto che il processo di traslocazione avviene attraverso una sola membrana cellulare, mentre nel sistema Gram negativo, per ottenere l'esposizione del polipeptide eterologo in superficie, sono necessari sia una traslocazione attraverso la membrana citoplasmatica sia una corretta integrazione del polipeptide eterologo all'interno della membrana cellulare esterna (Samuelson et al., 2002).

Altri fattori che possono interferire con il processo di traslocazione della proteina ricombinante sono la formazione di ponti disolfuro nel versante periplasmatico della membrana esterna (Isticato et al., 2004) o la presenza di qualche residuo amminoacidico carico o di natura idrofobica (Nguyen et al., 1995).

Approcci simili sono stati utilizzati anche per ottenere l'esposizione eterologa sulla superficie di spore batteriche, e, in particolare, di spore di *B. subtilis* (Isticato et al., 2001) (fig. 4B). Il sistema di *display* basato sulla spora presenta numerosi vantaggi rispetto agli altri sistemi basati su cellule batteriche. Un'alta stabilità e la non patogenicità sono solo alcune delle proprietà che rendono la spora di *B. subtilis* un buon candidato per la progettazione di efficienti vettori di *display* di antigeni eterologhi.

Come descritto nel paragrafo 1.2, le spore di *Bacillus* sono rivestite dalla tunica, una struttura proteica le cui caratteristiche di rigidità e compattezza permettono di utilizzare i suoi componenti strutturali come molecole di ancoraggio per ottenere l'espressione di polipeptidi eterologhi sulla superficie sporale. Tuttavia, attualmente, non ci sono ancora dettagliate conoscenze sui meccanismi di incorporazione delle proteine nella tunica, sulla natura dei componenti strutturali che formano la parte più esterna della tunica e sulla eventuale presenza sulla tunica sporale di specifici motivi di ancoraggio. Per ovviare a questa carenza di informazioni, i primi tentativi per esporre molecole eterologhe sulla

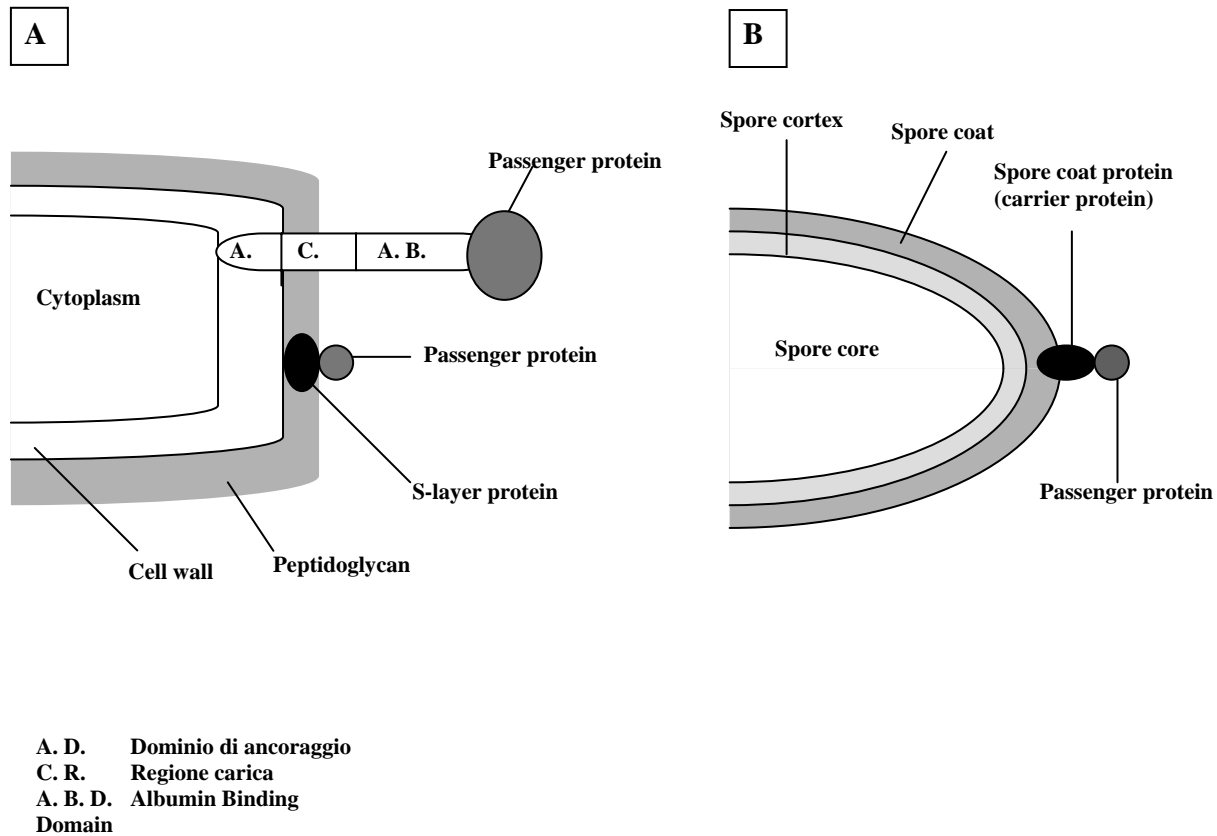


Figura 4. Sistema di esposizione superficiale in batteri Gram positivi. (A) sistema di esposizione superficiale usando la proteina A di *Staphylococcus aureus* e le proteine S-layer. (B) sistema di esposizione superficiale sulla spora usando le proteine della tunica.

superficie sporale sono stati effettuati selezionando come *carrier* solo alcuni componenti della tunica, sulla base della loro localizzazione superficiale già nota, come nel caso di CotB, (Isticato et al., 2001), o della loro abbondanza relativa, come nel caso di CotC (Mauriello et al., 2004) e CotG (Kim et al., 2005; Kwon et al., 2007). Il fatto che questi componenti della tunica siano indispensabili per la formazione di una spora apparentemente normale fornisce un' ulteriore motivazione per considerare positivamente le proteine CotB, CotC e CotG, come potenziali *carrier*.

1.3.1 CotB come proteina *carrier*

Come altri componenti della tunica, CotB è stata identificata come una proteina associata allo strato esterno della tunica sulla base di evidenze genetiche (Zheng et al., 1988).

Durante la sporulazione, il gene *cotB* viene trascritto solo nel compartimento della cellula madre mediante l'azione di due fattori, l'RNA polimerasi σ^k e la *DNA-binding protein* GerE (Henriques and Moran, 2000). CotB viene poi assemblato sulla spora in formazione sotto il controllo delle proteine CotE, CotG e CotH (Ozin et al., 2001).

Quindi, CotB o le eventuali proteine di fusione basate su CotB, non sono soggette al processo di traslocazione attraverso la parete cellulare, tipico degli altri sistemi di *display* di cui si è discusso nel paragrafo 1.1.

CotB presenta una regione C-terminale di natura idrofila formata da un modulo di 27 amminoacidi, ripetuto 3 volte, ricco in residui di serina, lisina e glutammina. I residui di serina rappresentano oltre il 50% dell'estremità C-terminale. I residui di lisina presenti nelle sequenze ripetute, molto probabilmente, costituiscono i siti di formazione di *crosslink* inter- o intra-molecolari, in analogia con le proteine collagene ed elastina tipiche del tessuto connettivo (Henriques and Moran, 2000; Kobayashi et al., 1998). La proteina CotB ha una massa molecolare dedotta di 46 KDa, ma migra su SDS-PAGE come un polipeptide di 66 KDa. La discrepanza tra il peso molecolare dedotto e quello apparente è stata spiegata in uno studio recente (Zilhao et al., 2004) in cui si dimostra che CotB viene inizialmente sintetizzata come una forma di 46 KDa che viene successivamente convertita in una forma di 66 KDa, presumibilmente un omodimero.

Per verificare la possibilità di utilizzare CotB come proteina *carrier*, sono stati selezionati 2 antigeni modello come proteine da esporre:

i) il frammento (non tossico) C-terminale della tossina tetanica, (TTFC), un peptide di 459 amminoacidi altamente immunogenico con una massa molecolare di 51,8 KDa (Helting and Zwisler, 1977), codificato dal gene *tetC* di *Clostridium tetanii* e

ii) la subunità B della tossina labile al calore di *Escherichia coli*, (LTB), un peptide di 103 amminoacidi e con massa molecolare di 12 KDa, codificato dal gene *eltB* (Douce et al., 1995).

La strategia per ottenere spore ricombinanti di *B. subtilis* che esprimono le fusioni CotB-TTFC e CotB-LTB in superficie si basava i) sull'uso del gene *cotB* e del suo promotore per la costruzione della fusione traduzionale e ii) sull'integrazione cromosomale delle fusioni geniche *cotB-tetC* e *cotB-eltB* all'interno della sequenza codificante del gene non essenziale *amyE* (Cutting and Vander-Horn, 1990). Il posizionamento della fusione genica sotto i segnali trascrizionali e traduzionali del gene *cotB* assicura che l'espressione della fusione avvenga nella opportuna fase della sporulazione, mentre l'evento di integrazione cromosomale assicura la stabilità genetica del costrutto. A causa della carenza di informazioni riguardo all'assemblaggio sulla tunica di CotB e sull'eventuale necessità di motivi di ancoraggio, i primi tentativi per costruire le fusioni geniche CotB-TTFC e CotB-LTB sono stati effettuati posizionando TTFC o LTB sia all'estremità C-terminale, sia all'estremità N-terminale, sia all'interno di CotB (FIG.5A).

Quando TTFC e LTB venivano fuse all'estremità C-terminale di CotB, le proteine chimeriche non venivano correttamente assemblate sulla superficie sporale (Isticato e Ricca, dati non pubblicati). Ciò poteva essere attribuito alla potenziale instabilità dei costrutti, sia a livello del

DNA sia a livello della proteina. Quindi, per escludere questa possibilità, TTFC e LTB venivano fuse all'estremità C-terminale della forma deleta di CotB, CotB Δ_{105} , priva dei 3 moduli ripetuti di 27 amminoacidi. A differenza della proteina di fusione intera, la proteina chimerica CotB Δ_{105} -TTFC veniva correttamente assemblata ed esposta sulla superficie sporale (Isticato et al., 2001). Un'analisi quantitativa effettuata per *dot blot* indicava che la quantità di fusione CotB Δ_{105} -TTFC esposta su ogni spora ricombinante ammontava a 0,00022 pg e che da ciascuna spora ricombinante era possibile estrarre $1,5 \times 10^3$ molecole di proteina ricombinante (Isticato et al., 2001).

Diversamente da CotB Δ_{105} -TTFC, la fusione CotB Δ_{105} -LTB non veniva correttamente assemblata. Il ceppo che esprimeva questa fusione mostrava una ridotta efficienza sia nella sporulazione sia nella germinazione, inoltre, le spore non erano resistenti al trattamento con lisozima. Queste osservazioni, insieme ad un'analisi per SDS-PAGE degli estratti proteici delle spore ricombinanti, suggerivano che la presenza della proteina CotB Δ_{105} -LTB alterava la formazione del rivestimento sporale.

Un'analisi *in-silico* mostrava omologia tra il prodotto chimerico e LytF, un'endopeptidasi associata alla parete cellulare e prodotta da *B. subtilis* durante la crescita vegetativa, avvalorando, così, l'ipotesi che la proteina

di fusione potesse interferire con la corretta formazione della tunica, degradandone qualche componente proteico (Kodama et al., 2000).

Oltre alla fusione al C-terminale, TTFC veniva utilizzato anche per costruire la fusione all'N-terminale di CotB e per la fusione *sandwich*, ottenuta inserendo TTFC all'interno di CotB (Fig. 5A).

In entrambi i casi, le fusioni venivano costruite utilizzando la forma deleta di CotB, CotB Δ_{105} , per evitare i problemi incontrati con la forma intera di CotB. Sia la fusione all'N-terminale sia la fusione *sandwich* davano prodotti chimerici che venivano assemblati sulla tunica sporale in modo corretto sia qualitativamente sia quantitativamente (Isticato et al., 2001).

Esperimenti di immunizzazione orale di gruppi di topi BALB/c hanno dimostrato che le spore ricombinanti che esprimono la fusione CotB-TTFC, sono in grado di indurre una risposta immunitaria sia mucosale, con produzione di significativi livelli di IgA fecali TTFC-specifici, sia sistemica con elevati titoli di IgG TTFC-specifici (Duc et al., 2003). Tale risposta immune risultava inoltre sufficiente a proteggere i topi immunizzati dall'infezione con dosi letali di tossina tetanica (Duc et al., 2003).

Da questi studi si deduce che, almeno nel caso di CotB, la fusione con una proteina eterologa non altera il processo di esposizione sulla superficie sporale.

1.3.2 CotC come proteina *carrier*

CotC è un componente della tunica sporale di *B. subtilis* di massa molecolare di 12 KDa e solubile agli alcali, precedentemente identificato con un approccio di genetica inversa (Donovan et al., 1987) e successivamente associato allo strato esterno della tunica sporale per evidenze genetiche (Zheng et al., 1988). CotC è stato inizialmente considerato come un potenziale *carrier* in base alla sua abbondanza relativa nella tunica. Insieme a CotG e CotD, CotC rappresenta circa il 50 % delle proteine solubili totali della tunica. Una quantità così relativamente alta potrebbe consentire l'assemblaggio di un numero significativo di chimere basate su CotC sulla tunica, assicurando, in tal caso, una buona efficienza di *display* di proteine eterologhe sulla spora. L'espressione del gene *cotC* avviene sotto il controllo di fattori regolativi specifici della cellula madre, l'RNA-polimerasi σ^k e le *DNA-binding proteins* GerE e SpoIIID. Come nel caso di CotB e CotG, CotC viene trascritto nella cellula madre e il suo assemblaggio sulla tunica non richiede il processo di traslocazione attraverso la membrana. Il prodotto primario del gene *cotC* è un polipeptide di 66 amminoacidi molto ricco in residui di tirosina (30,3 %) e di lisina (28,8 %) (Donovan et al., 1987). È stato recentemente dimostrato che CotC viene assemblato sulla tunica sporale in 4 distinte forme proteiche che variano in massa molecolare da 12 KDa a 30 KDa (Isticato et al., 2004). Due di queste, aventi massa

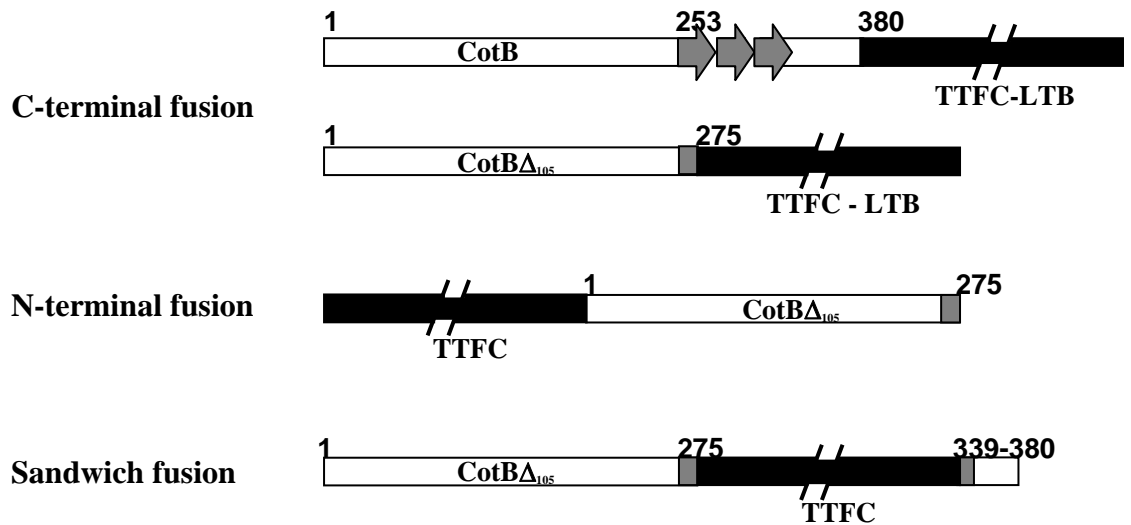
molecolare di 12 e 21 KDa e corrispondenti, con molta probabilità, alla forma monomerica e omodimerica di CotC, rispettivamente, vengono assemblate sulla spora in formazione immediatamente dopo la loro sintesi che avviene a circa 8 ore dall'inizio della sporulazione. Le altre due forme, di 12,5 e 30 KDa, derivano dalle due forme primarie a seguito di modifiche post-traduzionali che avvengono direttamente sulla superficie sporale durante la fase di maturazione della spora (Isticato et al., 2004).

Nel caso di CotC, sono state costruite solo fusioni al C-terminale (fig.5B) . Entrambe le fusioni geniche CotC-TTFC e CotC-LTB sono state ottenute clonando *tetC* o *eltB in-frame* con l'ultimo codone di *cotC* sotto il controllo trascrizionale e traduzionale del promotore del gene *cotC*. La fusione genica è stata quindi integrata sul cromosoma di *B. subtilis* al locus *amyE* tramite un evento di doppio *crossing-over* (Mauriello et al., 2004).

Entrambe queste proteine ricombinanti venivano assemblate sulla tunica delle spore ricombinanti senza produrre un effetto significativo sulla struttura delle spore e sulla loro funzione, in quanto esse apparivano identiche al *wild-type* in termini di efficienza di sporulazione, germinazione e di proprietà di resistenza. Analisi di *western blot*, di immunofluorescenza e, per CotC-TTFC, analisi di citofluorimetria mostravano che entrambe le fusioni basate su CotC venivano espresse

A

CotB come partner di fusione

**B**

CotC come partner di fusione

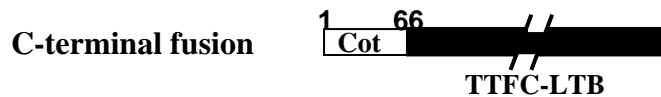


Figura 5. Rappresentazione schematica del sistema di esposizione sulle spore di *B. subtilis*. I rettangoli neri rappresentano le due proteine *passenger* TTFC (459 amminoacidi) e LTB (103 amminoacidi) (A) Rappresentazione schematica delle fusioni C-, N- e *sandwich* usando CotB come carrier. Le proteine CotB e CotB Δ_{105} (275 amminoacidi) sono state utilizzate come carrier per le fusioni al C-terminale. I tre moduli di 27 aa della proteina CotB intera viene indicata dalle frecce. (B). Rappresentazione schematica delle due proteine di fusione costruite utilizzando CotC come partner di fusione.

sulla superficie delle spore ricombinanti. Una determinazione quantitativa delle proteine ricombinanti esposte sulle spore di *B. subtilis* indicavano che circa $9,7 \times 10^2$ e $2,7 \times 10^3$ molecole di CotC-TTFC e CotC-LTB, rispettivamente, venivano estratte da ogni spora.

Come nel caso di TTFC, spore ricombinanti che esprimono la fusione CotC-LTB somministrate per via orale in un modello murino, generano specifiche risposte immunitarie sia mucosali sia sistemiche (Mauriello et al., 2004).

Secondo questi studi, sia con il sistema basato su CotC sia con il sistema basato su CotB Δ_{105} , venivano esposte sulla superficie sporale quantità comparabili di proteine eterologhe. Questo dato era inatteso in quanto CotC è molto più abbondante di CotB sulla tunica sporale. Ciò può essere spiegato con uno studio recente (Isticato, Scotto Di Mase et al., 2007) in cui viene dimostrato che la regione C-terminale di CotC è essenziale per l'interazione della proteina CotC con sé stessa e questa scoperta ha suggerito che l'uso di CotC come *carrier* poteva essere ottimizzato.

1.3.3 CotG come proteina *carrier*

CotG è una proteina della tunica sporale ad azione morfogenetica che è stata identificata grazie ad analisi genetiche (Sacco et al., 1995). Insieme a CotC e CotD, CotG rappresenta circa il 50 % delle proteine solubili

totali della tunica. Come nel caso di *cotB*, il gene *cotG* viene trascritto nella cellula madre mediante l'azione di due specifici fattori, σ^k e GerE (Sacco et al., 1995). Il prodotto primario del gene *cotG* appare a circa 8 ore dall'inizio della sporulazione e consiste di due forme di massa molecolare pari a 32 e 36 KDa (Zilhao et al., 2004). La forma di 32 KDa potrebbe rappresentare il prodotto non modificato del gene *cotG* (24 KDa) la cui anormale migrazione potrebbe essere dovuta alla sua inusuale struttura primaria (Sacco et al., 1995). Nelle successive fasi della sporulazione, CotG viene convertito in due polipeptidi di 36 e 70 KDa che probabilmente, durante l'assemblaggio sulla spora, formano dei complessi multimerici tenuti insieme da una serie di *crosslink*. È stato dimostrato che spore di un ceppo depresso nel gene *cotG* non solo sono prive della proteina CotG ma anche di CotB, indicando così che il polipeptide di 24 KDa è necessario per l'incorporazione di CotB sulla tunica sporale (Zilhao et al., 2004).

I primi tentativi per ottenere l'esposizione sporale utilizzando CotG come partner di fusione sono stati effettuati selezionando, come molecola eterologa modello, la streptavidina, una proteina utilizzata in svariate applicazioni di biotecnologia (Kim et al., 2005). La streptavidina ha una massa molecolare pari a 60 KDa, viene prodotta da *Streptomyces avidinii* e, in forma attiva, si presenta come una proteina tetramericata in grado di riconoscere e legare la biotina.

La fusione CotG-streptavidina è stata costruita inserendo un peptide *linker* (Gly₄Ser) tra l'estremità C-terminale di CotG e la streptavidina, in modo da assicurare un corretto *folding* della proteina ricombinante sulla superficie sporale. La localizzazione della streptavidina sullo strato esterno delle spore di *B. subtilis* è stata verificata con un'analisi FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorter*) effettuata utilizzando un anticorpo primario diretto contro la streptavidina. Per analisi FACS, le spore con la fusione *cotG-sav* mostravano una fluorescenza molto più intensa rispetto alle spore del ceppo parentale. Le spore *cotG-sav* sono state anche analizzate con un saggio di legame alla biotina che confermava la corretta funzionalità della proteina ricombinante. Questo dato veniva avvalorato da ulteriori analisi FACS, effettuate utilizzando, questa volta, un anticorpo coniugato con la biotina e con un fluoroforo, il FITC. I dati ottenuti dalla citometria a flusso indicavano che spore esprimenti la fusione CotG-streptavidina sono in grado di legare attivamente la biotina (Kim et al., 2005).

In studi successivi (Kwon et al., 2007), la proteina CotG è stata utilizzata per esporre un enzima modello, la β -Galattosidasi di *Escherichia coli*. Questo enzima veniva selezionato in quanto la sua attività idrolitica presenta interessanti potenzialità in campo industriale, per esempio, spore che esprimono sulla superficie una β -Galattosidasi attiva

potrebbero essere utilizzate in sistemi di reazione che avvengono in un ambiente bifasico (acqua-solvente organico).

Come nel caso della fusione CotG-streptavidina, la fusione CotG- β -Gal è stata costruita inserendo il gene *lacZ* al 3' del gene *cotG*. La corretta espressione della β -Galattosidasi sulla superficie sporale è stata determinata con saggi di attività β -Gal, mentre, per verificare la localizzazione delle spore ricombinanti in un sistema di solventi a due fasi, veniva utilizzata la tecnica di microscopia confocale (Kwon et al., 2007). Queste analisi indicavano che l'enzima β -Galattosidasi era in grado di funzionare correttamente sulla superficie sporale, utilizzando CotG come motivo di ancoraggio, e che le spore ingegnerizzate, trovandosi all'interfase, potevano catalizzare una reazione di transgalattosidazione, cioè di trasferimento di lattosio da una fase acquosa ad una organica, con un'efficienza notevolmente superiore rispetto al solo enzima β -Galattosidasi usato come controllo.

In base a queste ricerche, si può concludere che il sistema di *display* basato su CotG permette di esporre sulla superficie sporale diversi enzimi eterologhi e che può essere generalmente applicato in campo industriale per lo sviluppo di biocatalizzatori ad alte prestazioni (Kim et al., 2005).

1.4 Scopo della tesi

È ormai un concetto generalmente accettato che i sistemi di espressione di molecole eterologhe sulla superficie di virus e cellule trovano numerose applicazioni nello sviluppo di biosensori e biocatalizzatori, nell'identificazione di nuovi antibiotici o antigeni e nella progettazione di nuovi farmaci o vaccini. L'insieme di queste possibili applicazioni, anche se ancora incompleto, ha attirato l'interesse della comunità scientifica internazionale e ne ha incentivato una serie di studi volti all'ottimizzazione del *display* superficiale in vari sistemi-ospite.

In questo contesto si inserisce il mio lavoro di Tesi volto all'ottimizzazione del sistema di *display* basato sull'uso di spore di *Bacillus subtilis* per ottenere l'espressione di proteine eterologhe. Rispetto ad altri sistemi basati sull'uso di fagi o cellule batteriche, il sistema di esposizione basato sulla spora presenta numerosi vantaggi, inclusi un'alta stabilità e la non patogenicità. In particolare, con il mio lavoro di Tesi mi prefiggevo di: i) ottimizzare l'uso della proteina CotC come *partner* di fusione; ii) effettuare un'analisi comparativa *in vitro* di diversi sistemi procariotici di *display*; iii) verificare l'applicazione delle spore come vettori di vaccinazione, con l'esposizione di un antigene eterologo di origine virale.

i) Ottimizzazione dell'uso di CotC come partner di fusione

(Isticato, Scotto Di Mase et al., 2007)

I primi tentativi per ottenere l'espressione eterologa sulla superficie sporale sono stati effettuati selezionando, come *carrier*, le proteine CotC e CotB e, come antigeni modello, TTFC e LTB. Nel caso di CotC, TTFC e LTB venivano fusi all'estremità C-terminale (Mauriello et al., 2004) e la quantità di proteine ricombinanti esposta sulle spore era comparabile alla quantità precedentemente determinata (Isticato et al., 2001) con spore che esprimevano TTFC fuso alla proteina CotB.

Questo dato era inatteso poiché CotC è molto più abbondante di CotB in una spora matura (Henriques et al., 2000). Inoltre, studi preliminari hanno dimostrato che la porzione C-terminale di CotC svolge un ruolo cruciale nel processo di dimerizzazione e di assemblaggio della proteina.

In base a questi dati, per verificare la possibilità di migliorare il sistema di *display* basato su CotC, ho utilizzato la regione N-terminale della proteina. Ho, quindi, costruito, un vettore che consente l'inserzione di DNA eterologo tra il promotore e la regione codificante del gene *cotC* e che permette l'integrazione delle fusioni sul cromosoma di *B. subtilis*.

Ho validato l'uso di questo nuovo vettore basato su CotC utilizzando un peptide di soli 6 amminoacidi (6xHis-tag) e la proteina GFP (Green Fluorescent Protein) di 27 KDa mentre, per valutare l'efficienza di *display* del sistema, ho utilizzato la proteina TTFC (frammento C-

terminale della tossina tetanica di *Clostridium tetanii*) di 51 KDa. La strategia messa a punto presenta un'efficienza di *display* circa 5 volte superiore rispetto alle precedenti procedure (Mauriello et al., 2004) e, quindi, può essere valutata positivamente per svariate applicazioni, come per la possibilità di veicolare una determinata dose di antigene con un più basso numero di spore o per lo sviluppo di biocatalizzatori e biosensori ad alte prestazioni.

ii) Analisi comparativa di diversi sistemi procariotici di display.

(D'Apice et al., 2007).

Allo scopo di effettuare un'analisi comparativa *in vitro* di diversi vettori di vaccinazione di origine procariotica selezionavo il peptide 23 (pep23), un epitopo immunodominante sia per cellule B sia per cellule T-helper e derivante dalla subunità polimerasica della RT del virus HIV-1 (*Human Immunodeficiency virus-1*). Questo epitopo veniva presentato da:

- i) batteriofago filamentoso fd,
- ii) l'enzima E2 di *Bacillus stearothermophilus*,
- iii) la spora di *Bacillus subtilis*.

Ciascuno dei sistemi presentanti è stato quindi saggiato *in vitro* per la capacità immunogenica ed antigenica, verificando lo specifico riconoscimento del peptide da parte di un ibridoma T murino.

iii) Spore come vettori di vaccinazione

Allo scopo di verificare l'applicazione delle spore come vettori di vaccinazione decidevo di esporre sulla superficie delle spore un antigene di origine virale, la proteina NS3 (*Nonstructural 3*), di 631 amminoacidi e massa molecolare di circa 70 KDa, derivante dal processamento della poliproteina codificata dal genoma virale del virus HCV (*Hepatitis C Virus*). Il potere immunogenico di questo antigene è stato comprovato da esperimenti di immunizzazione in organismi murini e in scimpanzè, effettuati somministrando vettori adenovirali esprimenti la proteina NS3, che hanno prodotto una significativa risposta immunitaria di tipo CD8+ (Capone et al., 2006).

Per ottenere l'espressione della proteina NS3 sulla superficie sporale selezionavo come *partner* di fusione due componenti della tunica sporale, CotB e CotC, già precedentemente utilizzati per esporre, rispettivamente, TTFC (Isticato et al., 2001) e TTFC e LTB (Mauriello et al., 2004). In particolare, tenendo conto che il posizionamento della molecola *passenger* all'interno di una fusione genica è fondamentale per non interferire con la stabilità e la funzionalità della proteina ricombinante, decidevo di costruire 3 fusioni geniche inserendo NS3:

- i) al C-terminale della proteina CotC;
- ii) all'N-terminale della proteina CotC;
- iii) al C-terminale della proteina CotB.

L'analisi dell'espressione eterologa nelle spore dei ceppi ricombinanti ottenuti è tuttora in corso.

2. Materiali e Metodi

2.1 Ceppi batterici

I ceppi di *B. subtilis* utilizzati in questo studio sono elencati nella Tabella 6. Per gli esperimenti di clonaggio e di sequenziamento è stato utilizzato il ceppo di *Escherichia coli* *DH5 α* (*supE44 Δ lacU169 ϕ 80lacZ Δ M15*) *hsdR17 recA1*) (Sambrook et al., 1989).

Tabella 6: Ceppi di *B. subtilis* utilizzati.

Ceppo	Genotipo	Provenienza
PY79	<i>Wildtype</i>	Youngman et al.,1984
RH209	<i>cotC::spc cotU::neo</i>	questo lavoro
DS124	<i>cotC::spc cotU::neo amyE:: cotCtetC(N-term)</i>	questo lavoro
DS125	<i>cotC::spc cotU::neo amyE::cotCtetC(C-term)</i>	questo lavoro
DS127	<i>cotC::spc cotU::neo amyE:: cotCgfp(N-term)</i>	questo lavoro
DS120	<i>gerD:cwlD::spc cotU::neo cotC:: cat amyE:: cotC pep23</i>	questo lavoro
HC100	<i>amyE:: cotC ns3(N-term)</i>	questo lavoro
HC101	<i>amyE::cotCns3(C-term)</i>	questo lavoro
HC102	<i>amyE::cotBns3(C-term)</i>	questo lavoro

2.2 Terreni di coltura

Terreno TY: 0.5% di bacto-yeast extract, 1% di triptone, 0.5% di NaCl in H₂O distillata. Antibiotici utilizzati: ampicillina (50 mg ml⁻¹), cloramfenicolo (5 mg ml⁻¹), neomicina (5 mg ml⁻¹) e spectinomycin (50 mg ml⁻¹).

Terreno per l'induzione della sporulazione: Difco sporulation medium (DSM): 1 l di H₂O distillata; 8 g di Bacto-nutrient broth (*Difco*); 10 ml di KCl 10% (w/v); 10 ml di MgSO₄·7H₂O 1.2% (w/v); 0.5 ml di NaOH 1 M; il terreno veniva autoclavato e raffreddato a 50°C prima di aggiungere le seguenti soluzioni sterili: 1 ml di Ca(NO₃)₄ 1 M; 1 ml di MnCl₂ 0.01 M; 1 ml di FeSO₄ 1 mM. Cloramfenicolo e neomicina venivano aggiunti ad una concentrazione finale di 5 mg ml⁻¹, mentre la spectinomycin ad una concentrazione finale di 50 mg ml⁻¹.

Terreni per la preparazione di cellule competenti di *B.subtilis*: terreno SpC: 20 ml di T-base (0,4 g di (NH)₄SO₄; 3,66 g di K₂HPO₃H₂O; 1,2 g di KH₂PO₄; 0,2 g di trisodio citrato 2H₂O) autoclavato e raffreddato a 50°C prima di aggiungere le seguenti soluzioni sterili: 0,2 ml di glucosio 50%; 0,3 ml di MgSO₄·7H₂O 1,2%; 0,4 ml di bacto-yeast extract 10%; 0,5 ml di casamminoacidi 1%;

terreno SpII: 20 ml di T-base (0,4 g di (NH)₄SO₄; 3,66 g di K₂HPO₂3H₂O; 1,2 g di KH₂PO₄; 0,2 g di trisodio citrato 2H₂O)

autoclavato e raffreddato a 50°C prima di aggiungere le seguenti soluzioni sterili: 0,2 ml di glucosio 50%; 1,4 ml di $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2%; 0,2 ml di bacto-yeast extract 10%; 0,2 ml di casamminoacidi 1%; 0,1 ml di CaCl_2 0,1M.

Piastre: ai terreni liquidi venivano aggiunti, prima della sterilizzazione, 20 g/l di Bacto-agar (*Oxoid*) quindi autoclavati, raffreddati a 50°C e versate in capsule Petri sterili.

2.3 Tamponi di corsa per elettroforesi

Tampone di corsa per elettroforesi di DNA su gel di poliacrilammide (TBE 10X): 0.89M di Tris-HCl (pH 8), 0.89M di acido borico e 0.02M di EDTA.

Tampone di corsa per elettroforesi su gel di agarosio (TAE 10X): 0.89 M Tris-HCl (pH 8), 0.89 M di acido acetico e 0.02 M.

Tampone di corsa per elettroforesi di proteine SDS-PAGE (5X): 15.1 g di Tris base; 94 g di glicina, pH 8.3; 50 ml di 10% SDS; acqua bidistillata fino a 1 l.

2.4 Purificazione del DNA plasmidico su larga scala

Una singola colonia batterica veniva inoculata in 50 ml di TY, contenente 50 mg/ml di ampicillina e veniva fatta crescere una notte a 37°C. Le cellule venivano raccolte mediante centrifugazione a 6000 rpm,

per 5 min. a 4°C e risospeso in 1 ml di un tampone contenente: 25 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA pH 8; 50 mM Glucosio. Dopo 5 min. di incubazione a temperatura ambiente, venivano aggiunti 2 ml di tampone di lisi (0,2 M NaOH; 1% SDS) e la miscela veniva incubata per 5 min. in ghiaccio. Venivano quindi aggiunti 1,5 ml di una soluzione di 3M acetato di sodio, pH 5.2 e ripetuta l'ncubazione per 5 minuti in ghiaccio. Dopo centrifugazione a 7000 rpm, per 10 minuti a 4°C il sopranatante veniva recuperato, estratto con fenolo saturato con 0,1 M Tris e precipitato per aggiunta di 2.5 volumi di etanolo. Il DNA plasmidico veniva raccolto mediante centrifugazione a 7000 rpm, per 10 minuti a 4°C, lavato con 5 ml di etanolo 70%, per rimuovere eventuali sali precipitati, e risospeso in 0,5 ml di TE (Tris-HCl 10 mM pH 8.0 ed EDTA 0.1 mM pH 8.0).

La purificazione di DNA plasmidico mediante cromatografia veniva effettuata con i kit DNA MINI-PREP e DNA MIDI-PREP (*QUIAGEN*), seguendo il protocollo fornito dalla casa produttrice.

2.5 Digestione enzimatica

Il DNA plasmidico, ottenuto col protocollo sopra citato, veniva digerito con enzimi di restrizione in un volume finale di 20 µl, in presenza del tampone consigliato dalla casa fornitrice.

2.6 Elettroforesi su gel di agarosio

Gel di agarosio: 1 g agarosio (Molecular Biology Certified Agarose, *BIO-RAD*) in 100 ml TAE 1X supplementato con 1 µg/ml di bromuro di etidio.

Metodo: i campioni, a cui veniva aggiunto 1/10 del volume di una soluzione di caricamento (0.5% blu di bromofenolo; 30% glicerolo in acqua), venivano caricati su gel e fatti migrare a 100 Volts per 45 min. Accanto ai campioni veniva fatto migrare uno *standard* di peso molecolare costituito dal DNA del batteriofago λ . preventivamente digerito con l'enzima *Bst*II.

2.7 Eluizione del DNA da gel di agarosio

I frammenti di DNA venivano eluiti da gel d'agarosio utilizzando il protocollo per eluizione QIAquick Gel Extraction Kit (*QIAGEN*). In corrispondenza delle bande di DNA d'interesse il gel veniva tagliato in pezzetti minuti e questi posti in tubi da 1.5 ml. L'agarosio veniva disciolto aggiungendo 3 volumi di tampone QG (*QIAGEN*) e incubando a 50°C per 10 min. La soluzione veniva poi caricata su una resina capace di legare il DNA, mentre la soluzione acquosa veniva eliminata dopo centrifugazione a 13000 rpm, per 1 min. Il DNA veniva, infine, eluito con 30 µl di TE.

2.8 Reazione di ligasi

Il frammento di DNA (inserto) veniva unito al DNA vettore in un rapporto molare di 5:1 ed incubato in presenza di 3 unità di enzima T4 DNA ligasi (*Gibco*) e del tampone di reazione 5X fornito dalla casa fornitrice (*Gibco*) in un volume finale di 10-15 µl per 12 ore a 16°C.

2.9 Preparazione di cellule competenti e trasformazione di *E. coli*

Per rendere competenti all'ingresso di DNA cellule di *Escherichia coli*, una colonia batterica veniva inoculata in 5 ml di terreno TY e lasciata crescere a 37°C per 12 ore in agitazione. L'inoculo veniva diluito 1:100 in 30 ml di terreno TY e fatto crescere fino alla fase esponenziale (OD_{590nm} 0.4-0.6). Le cellule venivano centrifugate a 4000rpm, per 5 min. a 4°C, risospese in 15 ml di una soluzione 50 mM CaCl₂ preraffreddata ed incubate in ghiaccio per 30 min. Dopo centrifugazione le cellule venivano risospese in 2 ml di una soluzione contenente glicerolo al 15% e 50 mM CaCl₂, quindi aliquotate e conservate a -80°C.

La trasformazione veniva effettuata aggiungendo a 200 µl di cellule competenti, la miscela della reazione di ligasi; il tutto veniva incubato a 4°C per 30 min, poi a 42°C per 3 min, allo scopo di provocare uno shock termico necessario per il passaggio del DNA all'interno della cellula. Quindi venivano aggiunti 800 µl di TY ed i batteri venivano incubati a

37°C per 1 ora ed infine piastrati su piastre TY contenenti l'appropriato antibiotico.

2.9 Preparazione di cellule competenti e trasformazione di *E. coli*

Per rendere competenti all'ingresso di DNA cellule di *Escherichia coli*, una colonia batterica veniva inoculata in 5 ml di terreno TY e lasciata crescere a 37°C per 12 ore in agitazione. L'inoculo veniva diluito 1:100 in 30 ml di terreno TY e fatto crescere fino alla fase esponenziale (OD_{590nm} 0.4-0.6). Le cellule venivano centrifugate a 4000rpm, per 5 min. a 4°C, risospese in 15 ml di una soluzione 50 mM CaCl₂ preraffreddata ed incubate in ghiaccio per 30 min. Dopo centrifugazione le cellule venivano risospese in 2 ml di una soluzione contenente glicerolo al 15% e 50 mM CaCl₂, quindi aliquotate e conservate a -80°C. La trasformazione veniva effettuata aggiungendo a 200 µl di cellule competenti, la miscela della reazione di ligasi; il tutto veniva incubato a 4°C per 30 min, poi a 42°C per 3 min, allo scopo di provocare uno shock termico necessario per il passaggio del DNA all'interno della cellula. Quindi venivano aggiunti 800 µl di TY ed i batteri venivano incubati a 37°C per 1 ora ed infine piastrati su piastre TY contenenti l'appropriato antibiotico.

2.10 Preparazione del DNA e reazioni di sequenza

Ad un'aliquota di 50 μl di DNA, preparato come descritto al paragrafo 2.4, venivano aggiunti 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ di RNasi A e 40 g ml^{-1} di RNasi T1. Dopo incubazione di 30 minuti a 37°C , il DNA veniva precipitato con 30 μl di 20% PEG₆₀₀₀/2.5M NaCl, recuperato per centrifugazione, lavato con etanolo 70% e risospeso in 18 μl di H_2O . Il DNA veniva poi denaturato con 2 μl di NaOH 2 N per 5 minuti a temperatura ambiente e ri-precipitato con 2 μl di NH_4Ac 5 M e 50 μl di etanolo. Dopo centrifugazione, lavaggi in etanolo 70% e risospensione il DNA veniva risospeso in 6 μl di H_2O bidistillata cui venivano aggiunti 2 μl del primer (120 ng) e 2 μl di tampone 5X (Tris-HCl pH 7.5 200 mM, MgCl_2 100 mM e NaCl 250 mM). La miscela veniva incubata per 30 minuti a 37°C e ad essa venivano aggiunti 2 μl di dGTP mix, 1 μl di DTT 0.1 M, 1 μl a ^{35}S -dATP e 2 μl di T7 DNA polimerasi (*sequenase version 2.0 USB*). Prima dell'uso il dGTP mix, composto da dGTP 7.5 mM, dCTP 7.5 mM e dTTP 7.5 mM, veniva diluito 5 volte in H_2O e l'enzima DNA polimerasi (13 U ml^{-1}) veniva diluito 8 volte nel tampone di diluizione (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, DTT 5 mM e BSA 0.5 mg ml^{-1}). Dopo 5 minuti di incubazione a temperatura ambiente, la miscela di reazione veniva divisa in 4 campioni di 3.5 μl ciascuno, ed ognuno di essi era incubato a 37°C con 2.5 μl di uno dei quattro ddNTP. La reazione veniva

arrestata con 4 µl di una soluzione composta da formammide 95%, bromofenolo 0.05%, xilene cianolo 0.05% e EDTA 10 mM.

2.11 Elettroforesi di DNA su gel di acrilammide

Gel di poliacrilammide-urea al 6% (8M urea): 45 ml di poliacrilammide 40%, 30 ml di TBE 10X, 126 g di urea, H₂O fino a 300 ml.

Metodo: i campioni venivano riscaldati a 95°C per 3 minuti e caricati su gel. Dopo opportuna migrazione, il gel veniva seccato a 80°C sotto vuoto per 2 ore ed esposto con lastre autoradiografiche FUJI RX a temperatura ambiente per un tempo variabile, generalmente 12-18 ore.

2.12 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Frammenti di DNA venivano amplificati per Polymerase Chain Reaction (PCR), utilizzando DNA cromosomale o plasmidico come stampo.

Gli oligonucleotidi mostrati in Tab.7 (sintetizzati dalla *GIBCO BRL Custom Primers*), venivano utilizzati come innesco.

Nella miscela di reazione erano presenti: oligonucleotidi (5 µM), dNTP (0,2mM), MgCl₂ (1,5 mM), PCR buffer (*GIBCO*) e Taq DNA polimerasi (*GIBCO*, 5U), DNA stampo (20 ng).

Il programma di PCR eseguito prevedeva un primo ciclo di denaturazione (5 minuti a 95°C), 30 cicli di denaturazione (1 minuto a 95°C), annealing (1 minuto a 48-52°C, in base alla percentuale in C/G

Tabella 7: Oligonucleotidi utilizzati

Oligonucleotide	Sequenza (5'→3') ^a	Posizione di annealing ^b
TTFCsenso	CGGCCGtcaacaccaattccat	+340/+359
TTFCanti	CGCCGGCGaatcattgtcctccatc	+1705/+1720
GFPNotIFW	GCGGCCGCTaaggagaagaactttca	+3/+19
GFPNotIR	AAAGCGGCCGCTttgtatagttcatccatgcc	+693/+714
CotCp	ACATGCATGCtgtaggataaatcgttg	-179/-161
CotCstop	GTCGACTTAttagtagtgtttttatgc	+183/+201
Cpol1	<u>gccgctagcatcgatcgccg</u> atatactcctcc	+3/-12
Cpol2	<u>ccgatcgatgctagcgccg</u> catgggtattacaaaaatac	+1/+21
CotC-HindIII senso	acccAAGCTTtgtaggataaatcgttg	-179/-161
CotC-EcoRV anti	GATATCgtagtggtttttatgctt	+181/+201
CotB-HindIII senso	AAGCTTaccgattaggccgtttg	-263/-245
CotB-EcoRV anti	GATATCggatgattgatcatctgaag	+806/+825
NS5-EcoRV senso	GATATCatggcgcccatcacgg	+1/+16
NS3-EcoRI/SpeI anti	ACTAGTGAATTCttaagtacgacctccag	+1896/+1882
NS5-NotI senso	GCGGCCGCGcgccccatcacggcctac	+4/+21
NS3-NotI anti	GCGGCCGCTagtacgacctccaggctcag	+1896/+1877

^aLe lettere maiuscole indicano le basi dei siti di restrizione; le lettere minuscole indicano le basi complementari ai geni codificanti per TTFC, GFP, CotC o NS3; le lettere sottolineate indicano le regioni complementari tra gli oligonucleotidi interni.

^bLe posizioni di annealing si riferiscono alle sequenze di TTFC, GFP, CotC o NS3 con la prima base corrispondente all'inizio della traduzione indicata come + 1 (Isticato et al.,2004)

degli oligonucleotidi) e allungamento (1 minuto a 72°C) più 5 minuti a 72°C per la terminazione delle catene. I prodotti della reazione venivano poi visualizzati su gel di agarosio.

2.13 Preparazione di DNA cromosomale

Una colonia singola di *B. subtilis* veniva cresciuta in 25 ml di terreno TY a 37°C per 15-18 ore. La coltura batterica veniva centrifugata per 10 minuti a 5000 rpm a 4 °C e le cellule risospese in 4 ml di 50 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 mg lisozima ed incubata 10 min. a 37°C. Dopo aggiunta di 0,3 ml di 20% sarkosyl l'incubazione a 37°C veniva continuata per altri 5 min. e la sospensione cellulare estratta due volte con fenolo saturato con cloroformio. Il DNA cromosomale veniva quindi precipitato con due volumi di etanolo e raccolto per centrifugazione di 10 min. a 10000 rpm a 4 °C.

2.14 Preparazione di cellule competenti e trasformazione in *B. subtilis*

Una colonia singola veniva strisciata su piastra TY ed incubata a 30°C per 12 ore. Tutte le colonie venivano recuperate, incubate in 20 ml di SpC e lasciate crescere a 37°C con agitazione. Dopo 4 ore, 2 ml di cellule venivano prelevati, inoculati in 20 ml di SpII e lasciati a 37°C con agitazione molto lenta per 1,5 ore. La coltura veniva quindi

centrifugata a 7000 rpm per 5 minuti a temperatura ambiente ed il pellet veniva risospeso in 1,8 ml di sopranatante precedentemente recuperato e 0,2 ml di glicerolo al 100%. Le cellule venivano quindi aliquotate e conservate a -80°C .

Per la trasformazione ad un'aliquota di cellule competenti, rapidamente scongelata a 37°C , veniva aggiunto un uguale volume di SpII contenente EGTA nel rapporto di 50 a 1. I batteri venivano quindi incubati a 37°C con agitazione per 40 minuti e piastrati su TY contenente l'opportuno antibiotico.

2.15 Induzione della sporulazione in *B. subtilis* e purificazione delle spore

La sporulazione veniva indotta per esaurimento dei substrati di crescita (Harwood and Cutting, 1990). Una colonia singola di *Bacillus subtilis* veniva inoculata in 2.5 ml di TY e incubata per 5-6 ore in condizione di forte agitazione; 0.5 ml di tale inoculo veniva trasferito in 200 ml di DSM ed incubato a 37°C con forte agitazione. L'aumento della densità cellulare veniva seguito mediante letture spettrofotometriche effettuate a 590 nm e la crescita cellulare registrata, tracciando una curva di crescita su carta semilogaritmica. La fine della fase esponenziale viene considerata per convenzione come l'inizio del processo di sporulazione e viene indicata come T_0 .

Dopo 24 ore di crescita la coltura veniva centrifugata a 10.000 rpm (Bekman J2-HS) a 4°C per 10 min. e sottoposta a due cicli di lavaggio con: i) 50 ml di una soluzione contenente 1 M KCl-0.5 M NaCl; ii) 50 ml di 50 mM Tris, pH 7.2. Dopo incubazione di 30 min. a 37°C con lisozima (50 µg/ml) per eliminare le cellule vegetative eventualmente rimaste, le spore venivano raccolte e sottoposte ad una serie di lavaggi con: i) 1M NaCl; ii) H₂O deionizzata; iii) 0.05% SDS; iv) TEP (50 mM Tris, pH 7.2; 10 mM EDTA; 2 mM fenilmetilsulfonilfluorato); v) H₂O deionizzata. Le spore venivano aliquotate e risospese in 0,5 ml di H₂O deionizzata e conservate a -20°C.

2.16 Estrazione delle proteine del rivestimento sporale

Il numero delle spore purificate ottenuto veniva determinato per conta di diluizioni seriali con la camera di Burker al microscopio ottico (Olympus BH-2 con lenti 40x). Un'aliquota ($>1 \times 10^{10}$ spore/ml) di spore veniva centrifugata a 12.000g per 10 min. a 4°C, risospesa in 100 µl di una soluzione di NaOH 0.1 M e incubata per 30 min. a 4°C per solubilizzare le proteine della tunica sporale. La miscela veniva centrifugata a 12.000g per 10 min. in ghiaccio e il sopranatante, contenente le proteine, veniva raccolto e conservato a -20°C.

2.17 Determinazione della concentrazione proteica

La concentrazione delle proteine estratte veniva determinata mediante saggio colorimetrico (saggio *Bradford*). All'estratto proteico, portato ad un volume di 800 µl con H₂O deionizzata, venivano aggiunti 200 µl di BIO-RAD *protein assay* (BIO-RAD) ed il colore sviluppato misurato spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 595nm. La concentrazione della proteina veniva ricavata riportando i valori ottenuti su una retta di taratura, costruita utilizzando una soluzione di BSA (sieroalbumina bovina) di concentrazione nota.

2.18 Elettroforesi di proteine su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE)

Stacking Gel al 5% di poliacrilammide (*upper gel*): 0.83 ml di 30% acrilammide-bisacrilammide (37.5:1); 0.63 ml 1 M Tris/HCl, pH 6.8; 50 µl di 10% (SDS); 50 µl di 10% persolfato di ammonio (APS); 5 µl di TEMED; acqua deionizzata fino a 5 ml.

CotC-GFP (paragrafo 3.1): Resolving Gel al 10% di poliacrilammide (*lower gel*): 3.3 ml di 30% acrilammide-bisacrilammide (37.5:1); 2.5 ml di 1.5 M Tris-HCl, pH 8.8; 1000 µl di 10% SDS; 100 µl di 10% di ammonio per solfato; 4 µl di TEMED; acqua deionizzata fino a 10 ml.

CotC-TTFC (paragrafo 3.1): Resolving Gel al 7% di poliacrilammide (*lower gel*) 1,166 ml di 30% acrilammide-bisacrilammide (37.5:1); 0.65

ml di 3 M Tris/HCl, pH 8.8; 50 μ l di 10% SDS; 50 μ l di 10% APS; 2,5 μ l di TEMED; acqua fino a 5 ml.

2.19 Colorazione di gel di poliacrilammide per Coomassie

Il gel veniva fissato e colorato mediante immersione nella soluzione colorante (625 mM coomassie brilliant-blue; 50% metanolo; 10% acido acetico) per 30 min., quindi decolorato con la soluzione (50% metanolo-10% acido acetico). Il gel veniva poi lasciato 1 ora nella soluzione decolorante a cui veniva aggiunto glicerolo al 10% ed infine seccato a 80°C sotto vuoto per 2 ore.

2.20 Elettrotrasferimento di proteine e *Western blot*

Il gel di poliacrilammide veniva trasferito su una membrana Immobilon-Ny+ (*Millipore*), utilizzando l'apparecchio *trans-blott-cell* (*BIO-RAD*). Il trasferimento veniva eseguito a 420 mA (31 Volts) per 30 minuti utilizzando come tampone per elettrotrasferimento: 10X TRIS-glicina (250 mM TRIS pH 8.3 e 1.92M glicina), metanolo 100%.

Per verificare l'esito dell'elettrotrasferimento, la membrana veniva colorata con una soluzione di Ponceau S (*Sigma*) e quindi decolorata con acqua bidistillata fino alla completa scomparsa del colore rosso. La membrana veniva poi incubata in 100 ml di soluzione di saturazione costituita da 1X PBS (10X PBS (*Phosphate buffered saline*), pH 7.2: 80

mM Na₂HPO₄; 20 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O; 100 mM NaCl); 0.1% Tween 20; 8 gr di dry milk) per 16-18 ore a 4°C. Dopo lavaggi con 0.1X PBS e 0.1% Tween 20 (*Sigma*), la membrana veniva incubata con l'anticorpo primario policlonale anti-CotC (Igtech, Salerno, Italia) diluito 1:5000 a temperatura ambiente per 1 ora, nuovamente lavata con la soluzione PBS-Tween 20 ed incubata con l'anticorpo secondario (*anti-rabbit* coniugato con perossidasi, *Sigma*) a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo ulteriori lavaggi con PBS-Tween 20 venivano visualizzate le proteine riconosciute dall'anticorpo con il metodo ECL (*Amersham*), seguendo le istruzioni della ditta fornitrice.

2.21 Dot blot e analisi densitometrica

Diluizioni seriali di campioni proteici e di standard (CotC purificato) a concentrazioni iniziali note venivano trasferite su membrana di nitrocellulosa (*Bio-rad*), utilizzando l'apparecchio Bio-Dot Microfiltration Apparatus (*Bio-Rad*). La membrana veniva incubata in 100 ml di soluzione di saturazione costituita da 1X PBS (10X PBS (*Phosphate buffered saline*), pH 7.2: 80 mM Na₂HPO₄; 20 mM NaH₂PO₄ x 2H₂O; 100 mM NaCl); 0.1% Tween 20; 8 gr di dry milk) a temperatura ambiente per un'ora. Dopo lavaggi con 0.1X PBS e 0.1% Tween 20 (*Sigma*), la membrana veniva incubata con l'anticorpo primario anti-CotC diluito 1:5.000 nel tampone 1x PBS-0.1% Tween20 per 16-18 ore

a 4°C, nuovamente lavata con la soluzione PBS-Tween 20 ed incubata con l'anticorpo secondario (*anti-rabbit* coniugato con fosfatasi alcalina, *Sigma*) a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo ulteriori lavaggi con PBS-Tween 20 la membrana veniva colorata con il sistema BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium, *Bio-Rad*) e sottoposta ad analisi densitometrica mediante il programma *Fluor-S Multimager* (*Bio-Rad*).

2.22 Over-espressione e purificazione della proteina CotC in *E. coli*

Soluzione A (10X): Urea 480.04 g; NaH₂PO₄ 14.20 g; Tris-HCl 1.2g; pH 8.0; per 100 ml; soluzione B (10X): Urea 480.04 g; NaH₂PO₄ 14.20 g; Tris-HCl 1.2g; pH 6.3; per 100 ml; soluzione C (10X): Urea 480.04 g; NaH₂PO₄ 14.20 g; Tris-HCl 1.2g; pH 4.5; per 100 ml.

Metodo: una coltura di 30 ml del ceppo ricombinante RH52 (Isticato et al., 2004) derivato da BL21 (DE3) (Invitrogen) contenente una fusione *in frame* del 5' di *cotC* a 6 codoni per istidine, veniva cresciuta a 37°C fino a 0.7 OD₆₀₀ e quindi indotta con isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) 0.5 mM. Dopo tre ore d'incubazione a 37°C le cellule venivano poi centrifugate a 5.000 g, per 10 min a 4°C ed il *pellet* utilizzato per l'estrazione delle proteine. Le cellule venivano lisate in 1.2 ml di soluzione A 1X ed incubate per 60 min. in agitazione a temperatura ambiente. Il sopranatante, contenente l'estratto proteico,

ottenuto dopo centrifugazione a 10.000 g per 10 min., veniva caricato su una colonnina Ni-Spin Kit (Ni-nitrilotriacetic acid affinity chromatography Kit, *Qiagen*), precedentemente equilibrata caricando 0.6 ml di soluzione A 1X e centrifugandola 2.000 g per 2 min. La colonnina veniva lavata per centrifugazione a 2.000 giri per 2 min. con la soluzione B 1X. Successivamente le proteina legate alla colonnina venivano eluite con 0.2 ml della soluzione C 1X.

Dopo l'eluizione, veniva controllata l'avvenuta purificazione caricando un'aliquota dell'eluato su gel di SDS PAGE 10% e la concentrazione proteica del campione veniva determinata per saggio colorimetrico *Bradford*.

2.23 Microscopia a fluorescenza e immunofluorescenza.

Per la localizzazione di CotC-GFP, 500 µl di cellule venivano raccolte a 6 e 8 ore dall'inizio della sporulazione, centrifugate e il *pellet* veniva risospeso in 30 µl di PBS (*Phosphate-Buffered Saline*). 3 µl di cellule venivano spottate su un vetrino porta-oggetti per microscopio, coperto da un vetrino copri-oggetto preventivamente trattato con una soluzione di poly-L-lisina (0.1%, *Sigma*).

La microscopia a immunofluorescenza veniva effettuata secondo un protocollo riportato in letteratura (Harry et al., 1995; Pogliano et al., 1995) apportando le seguenti modifiche: i) un' aliquota di 1 ml di cellule

in sporulazione venivano fissate direttamente nel terreno di coltura con una concentrazione finale di 80% (w/v) di metanolo per 1 ora a temperatura ambiente prima della permeabilizzazione con lisozima; ii) le cellule fissate venivano marcate con una soluzione al 2% di dry milk-PBS contenente l'anticorpo di *rabbit* anti-CotC diluito 1:500 per 1 ora a temperatura ambiente, lavate 3 volte e poi incubate con un anticorpo anti-*rabbit* (IgG-FITC, *Sigma*) per 2 ore a temperatura ambiente e al buio; iii) dopo 10 lavaggi, i vetrini venivano montati sotto le lenti del microscopio e quindi osservati.

La microscopia a fluorescenza e l'immunofluorescenza venivano effettuati con un microscopio Olympus BX51, con obiettivo 100x UPlanF1 e filtri U-WIBA (filtri di eccitazione tra 460-490 nm, filtri-barriera tra 515-550 nm). I tempi di esposizione erano compresi nell'intervallo tra 500 e 1000 ms. Le immagini venivano catturate con il *software* analySIS (SIS).

2.24 Analisi sull'antigenicità, sull'immogenicità e analisi clonotipica.

I protocolli degli esperimenti descritti nel paragrafo 3.2 sono riportati in maniera esaustiva nella pubblicazione D'Apice et al., 2007 (*Vaccine*. 25: 1993-2000), allegata a questa Tesi.

3. Risultati

Paragrafo 3.1

Isticato, Scotto Di Mase et al., 2007. *Bio Techniques*. 42:151-6

I risultati descritti qui di seguito sono stati oggetto di una pubblicazione (Isticato, Scotto Di Mase et al., 2007) qui allegata e riportano una strategia di ingegnerizzazione di spore di *B. subtilis* che consente di ottimizzare l'espressione di antigeni eterologhi sulla superficie sporale.

Il sistema di display basato sulla spora, finora utilizzato per l'espressione di antigeni (Isticato et al., 2001; Mauriello et al., 2004; Ducle et al., 2003) ed enzimi (Kim et al., 2005), si basa sulla costruzione di fusioni geniche tra il DNA eterologo, codificante per la molecola “passeggera”, ed un gene di *Bacillus subtilis* codificante per un componente proteico della tunica sporale, il “carrier” (Isticato et al., 2004). In particolare la proteina CotC, un componente della tunica sporale di *B. subtilis* di 66 amminoacidi, localizzato sullo strato esterno elettrondenso del rivestimento sporale (Henriques & Moran, 2007), è stata utilizzata con successo per esporre sulla superficie sporale sia il frammento C della tossina tetanica (TTFC) di circa 50 Kda di peso molecolare che la subunità B della tossina labile al calore di *Escherichia coli* (LTB) di dimensioni molecolari notevolmente inferiori (11 Kda) (Mauriello et al., 2004). In un recente studio, (Mauriello et al., 2004), viene riportato che la quantità di fusione CotC-TTFC esposta sulla superficie di ogni spora ricombinante è paragonabile a quella già precedentemente calcolata per spore che esprimono l'antigene TTFC fuso ad un'altra proteina della

tunica sporale, CotB (Isticato et al., 2001). Questo risultato è inatteso in quanto CotC è molto più abbondante di CotB nella tunica sporale (Henriques et al., 2000).

Basandomi su questi dati, ho ipotizzato che l'uso di CotC come partner di fusione potesse essere ottimizzato.

Per verificare la possibilità di ottimizzare l'efficienza di esposizione di proteine ricombinanti basate sull'uso di CotC, sono stati svolti degli studi preliminari. Queste ricerche partivano dalla costruzione di due fusioni geniche ottenute inserendo un frammento di DNA codificante per un peptide di 6 istidine *in-frame* o all'estremità 3' o all'estremità 5' del gene *cotC*. Ciascuna fusione veniva successivamente clonata in un vettore integrativo e quindi trasferita sul cromosoma di *B. subtilis* con un evento di doppia ricombinazione per garantirne la stabilità genetica. Il ceppo recipiente, chiamato RH209 (tab.6), conteneva una copia interrotta sia del gene *cotC* sia del gene *cotU*, un omologo di *cotC* il cui prodotto proteico viene riconosciuto dall'anticorpo anti-CotC (Isticato et al., 2004).

Spore purificate dai ceppi ricombinanti ottenuti venivano quindi utilizzate per estrarre le proteine della tunica sporale secondo il protocollo indicato in Materiali e Metodi. Le proteine estratte venivano poi analizzate mediante esperimenti di *western blot*, utilizzando come anticorpo primario un anticorpo policlonale diretto contro CotC.

I risultati ottenuti indicavano che, quando viene bloccata l'estremità N-terminale della proteina CotC con il *tag* di 6 istidine, la proteina di fusione si assembla sulla superficie sporale nella forma monomerica e nella forma omodimerica, così come accade per la proteina selvatica (Isticato et al., 2004). Invece, quando viene bloccata l'estremità C-terminale della proteina CotC con lo stesso *tag*, la proteina di fusione si assembla sulla superficie sporale nella sola forma monomerica (dati non mostrati). Ciò indicava, quindi, che la regione C-terminale della proteina CotC svolge un ruolo cruciale nel processo di assemblaggio e di omodimerizzazione della proteina, suggerendo l'estremità N-terminale di CotC come un ottimale sito di inserzione di proteine eterologhe da esporre sulla superficie sporale.

In base ai dati sopra riportati, decidevo di ottimizzare il sistema di esposizione sporale sfruttando l'estremità N-terminale della proteina CotC. La strategia generale che ho seguito per semplificare il clonaggio di DNA eterologo tra la regione regolatoria e la regione codificante del gene *cotC* consisteva nell'inserire un frammento di DNA contenente tre siti di restrizione a valle del promotore e del sito di legame dei ribosomi di *cotC* e a monte della regione codificante del gene, *in-frame* con il sito d'inizio della traduzione. Questa copia modificata del gene *cotC* veniva poi clonata in un vettore d'integrazione che consente, tramite un evento di doppio *crossing-over*, la sostituzione del gene non essenziale *amyE*

sul cromosoma di *B.subtilis* con il DNA plasmidico. Ho valutato la validità del sistema così ottenuto utilizzando la proteina GFP (Green Fluorescent Protein) (Chalfie et al., 1994), e ne ho valutato l'efficienza di display utilizzando invece la proteina TTFC (frammento C-terminale della tossina tetanica di *Clostridium tetanii*) (Isticato et al., 2001).

3.1.1. Costruzione del vettore d'integrazione per fusioni basate su CotC.

Per inserire tre siti di restrizione *EagI*, *ClaI* e *NotI* nella regione compresa tra il promotore e la porzione codificante del gene *cotC*, utilizzavo la tecnica detta “*Gene Splicing by Overlap Extension*” (Gene SOEing) (Horton et al., 1990) che avvalendosi della *Polymerase Chain Reaction* (PCR) consente di produrre rapidamente frammenti di DNA ricombinante.

In particolare, seguivo 3 programmi di PCR (fig. 6) descritti di seguito: un frammento di 182 bp corrispondente all' intero promotore del gene *cotC* ed uno di 177 bp corrispondente alla sequenza codificante venivano amplificati da DNA cromosomale di *B. subtilis* utilizzando rispettivamente le coppie di oligonucleotidi CotCp/Cpol1 e Cpol2/CotCstop (tab .7) .

L' oligonucleotide Cpol1 veniva disegnato in modo tale che, al 3', annilasse con il promotore del gene *cotC* e che contenesse, al 5', 21bp

corrispondenti a parte della sequenza del *polycloning site* e complementari con l'estremità 5' dell'oligonucleotide Cpol2. Analogamente, la sequenza dell'oligonucleotide Cpol2 veniva progettata in modo tale che fosse complementare, al 3', con la regione codificante del gene *cotC* e che avesse, al 5', 21 bp di complementarità con l'estremità 5' dell'oligonucleotide Cpol1.

In questo modo si ottenevano i seguenti prodotti di amplificazione : i) un frammento di 206 bp corrispondente al promotore del gene *cotC* con parte del *polycloning site* fuso alla regione 3', ii) un frammento di 201 bp corrispondente alla sequenza codificante del gene *cotC* con parte del *polycloning site* fuso alla regione 5'.

Tali prodotti venivano purificati e quantizzati su gel d'agarosio.

30 ng di ciascun frammento venivano separatamente amplificati, mediante un secondo programma di PCR della durata di 7 cicli, utilizzando soltanto l'oligonucleotide CotCp per il primo frammento (oligonucleotide esterno) e l'oligonucleotide CotCstop per il secondo frammento (oligonucleotide esterno). In questo modo era possibile ottenere grandi quantità del filamento 5'-3' del promotore di *cotC* compreso di parte del *polycloning site* fuso all'estremità 3' e del filamento 3'-5' della regione codificante di *cotC* compreso di parte del *polycloning site* fuso all'estremità 5'. Al termine della seconda PCR le miscele di reazione per i due frammenti venivano unite e sottoposte ad

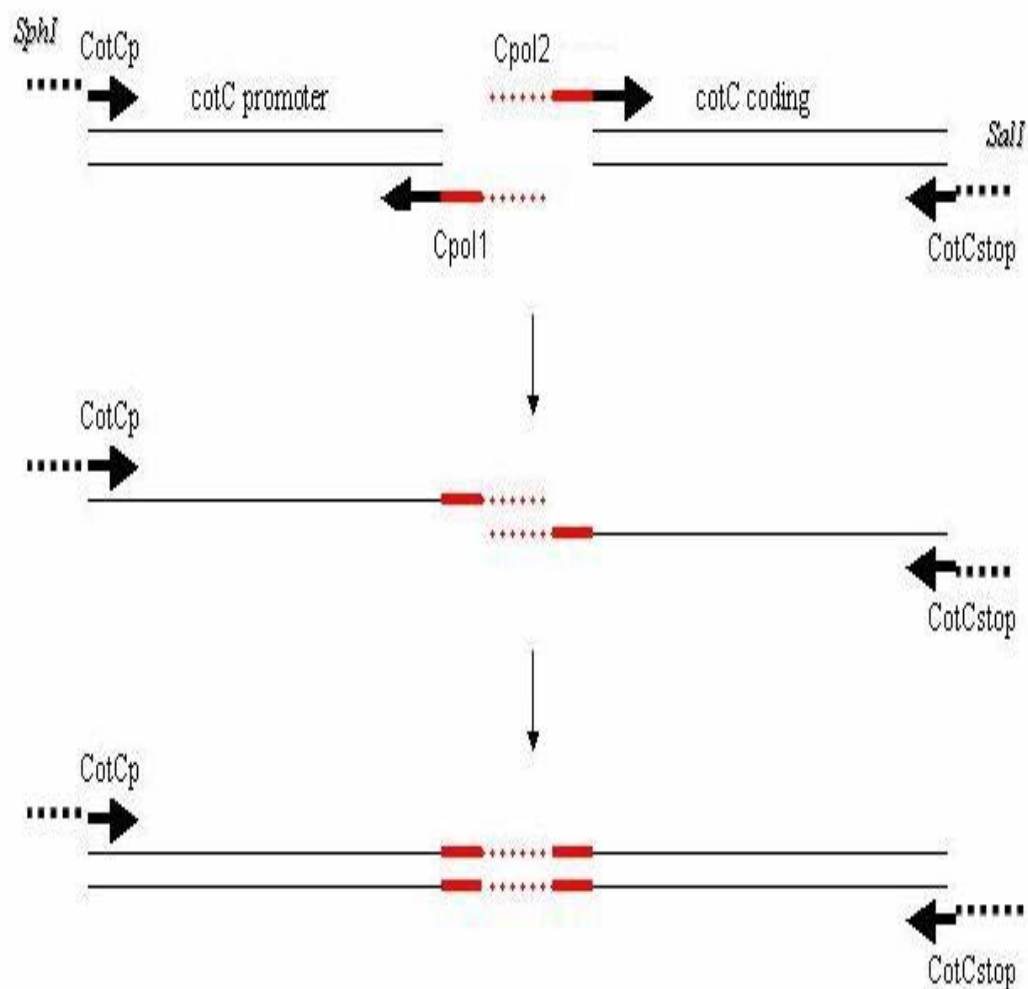


Figura 6 : Schema del *Gene SoEing* seguito per inserire tre siti di restrizione al 5' del gene *cotC* mediante tre programmi di PCR. Sono riportati: gli oligonucleotidi (freccie), i siti di restrizione presenti (tratteggio scuro) ; la sequenza corrispondente al *polycloning site* (rosso) e di questa la regione di complementarità fra gli oligo interni Cpol1 e Cpol2 (tratteggio viola) e i frammenti di DNA stampo (linee scure).

un terzo programma di PCR di 20 cicli durante il quale l'appaiamento dei due frammenti in corrispondenza della regione centrale consentiva di ottenere la fusione genica delle dimensioni attese di 423 bp, osservabile su gel d'agarosio .

La fusione ottenuta veniva purificata e clonata nel vettore commerciale pGemT-easy (*Promega*) ed il plasmide ricombinante così ottenuto veniva chiamato pED16. Questo plasmide veniva sottoposto a sequenza nucleotidica con il metodo di Sanger (Sambrook et al., 1989), nella regione compresa tra il promotore e il coding del gene *cotC*.

La fusione veniva poi escissa dal plasmide pED16 mediante digestione con gli enzimi di restrizione *SphI* e *SalI* e trasferita nel vettore d'integrazione pDG364 (Cutting & Vander Horn, 1990.), precedentemente digerito con gli stessi enzimi di restrizione, ottenendo il plasmide pDS17. Questo vettore, che funge da *shuttle* tra *E.coli* e *B. subtilis*, presenta come marcatore selezionabile in *B.subtilis* il gene per la resistenza all'antibiotico cloramfenicolo (*cat*) inserito, insieme ad un *polycloning site*, tra due regioni del gene non essenziale *amyE* di *B. subtilis* (Cutting & Vander Horn , 1990) chiamate *amy-front* e *amy-back* (fig. 7).

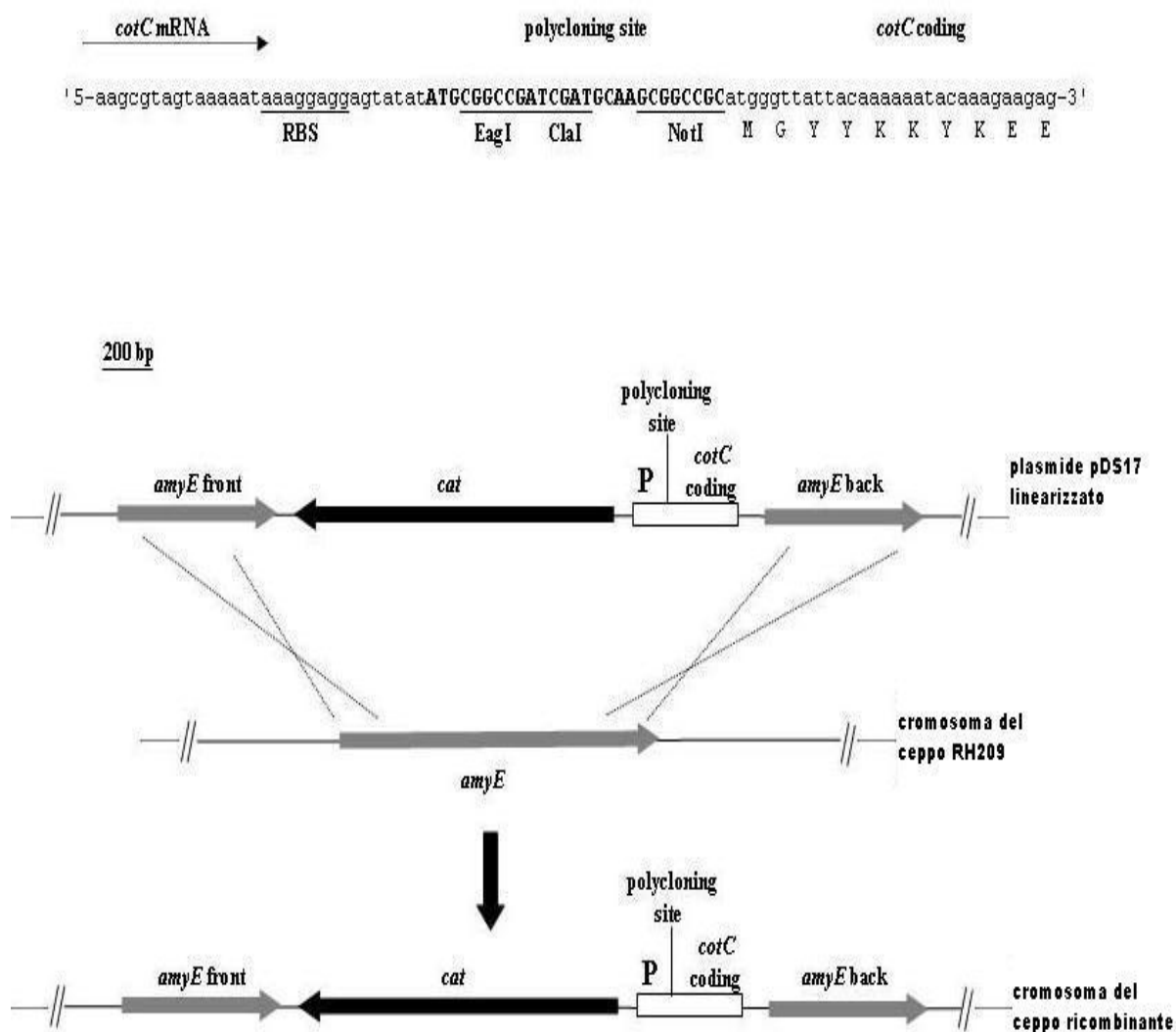


Figura 7. Rappresentazione del plasmide pDS17 e dell'evento di ricombinazione sul cromosoma. La sequenza nucleotidica del polycloning site è riportata in lettere maiuscole. Le lettere sottolineate rappresentano il sito di riconoscimento per gli enzimi di restrizione indicati in basso e per i ribosomi (indicato come RBS).

3.1.2. Costruzione delle fusioni geniche

Per costruire le fusioni CotC-TTFC e CotC-GFP all’N-terminale di CotC, frammenti di 1380bp (*tetC*) e di 711bp (*gfp*) venivano ottenuti per PCR amplificando, rispettivamente, *tetC* da DNA cromosomale del ceppo RH103 (Isticato et al., 2001) e *gfp* dal plasmide pAD123 (*Bacillus* Genetic Stock Center; BGSC, www.bgsc.org). Come primers venivano utilizzati le coppie di oligonucleotidi TTFC-senso e TTFC-anti (tab.7), GFP- *Not*IFW e GFP- *Not*IR (tab.7). I prodotti di PCR venivano clonati nel vettore commerciale pGemT-easy (*Promega*), ottenendo i plasmidi pDS18 (TTFC) e pDS23 (GFP). I frammenti di DNA codificanti per TTFC e per GFP venivano purificati da gel d’agarosio e clonati nel vettore pDS17 ottenendo i plasmidi pDS24 (CotC-GFP) e pDS21 (CotC-TTFC). I plasmidi pDS21 e pDS24 venivano linearizzati con gli enzimi *Pvu*II e *Kpn*I, rispettivamente, e usati per trasformare cellule competenti del ceppo RH209 secondo il protocollo indicato in Materiali e Metodi.

Per confermare la corretta integrazione delle fusioni geniche in corrispondenza del locus *amyE*, diversi cloni Cm^r venivano testati per PCR usando come stampo il DNA cromosomale e gli oligonucleotidi AmyS (5’-CCAATGAGGTTAAGAGTATTCC-3’, +569/+590) ed AmyA (5’-CGAGAAGCTATCACCGCCCAGC-3’, +2128/+2150) come primers.

Due cloni, uno per ogni trasformazione, venivano chiamati DS124 (CotC-TTFC) e DS127 (CotC-GFP) e selezionati per successive analisi.

3.1.3 Analisi dell'espressione eterologa nel nuovo sistema

Allo scopo di verificare che la fusione CotC-GFP fosse correttamente espressa e assemblata sul rivestimento sporale coltivavo le cellule del ceppo DS127 e del ceppo isogenico RH209 in terreno DSM (Difco-Sporulation-Medium) per indurre la sporulazione. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C in condizioni aerobiche, purificavo le spore e le trattavo, come descritto in Materiali e Metodi, per estrarre le proteine di rivestimento. Analizzavo le proteine con esperimenti di *western blot* con anticorpo anti-CotC. Poiché entrambi i ceppi contenevano una mutazione nulla nel gene *cotC* (e nel suo omologo strutturale *cotU*), era atteso che l'anticorpo anti-CotC riconoscesse solo le proteine di fusione basate su CotC. Come previsto, (fig.8 pannello A) nessuna proteina veniva riconosciuta tra quelle estratte dalle spore RH209; mentre tra le proteine estratte dalle spore DS127 l'anticorpo anti-CotC ne riconosceva due del peso molecolare di circa 40 KDa e 80 KDa. Poiché GFP è una proteina di 27 KDa (Chalfie et al., 1994) e la forma monomerica di CotC migra su SDS-PAGE come una banda di 12 KDa (Isticato et al., 2004), il peso molecolare della proteina di 40 KDa è quello atteso per la fusione CotC-

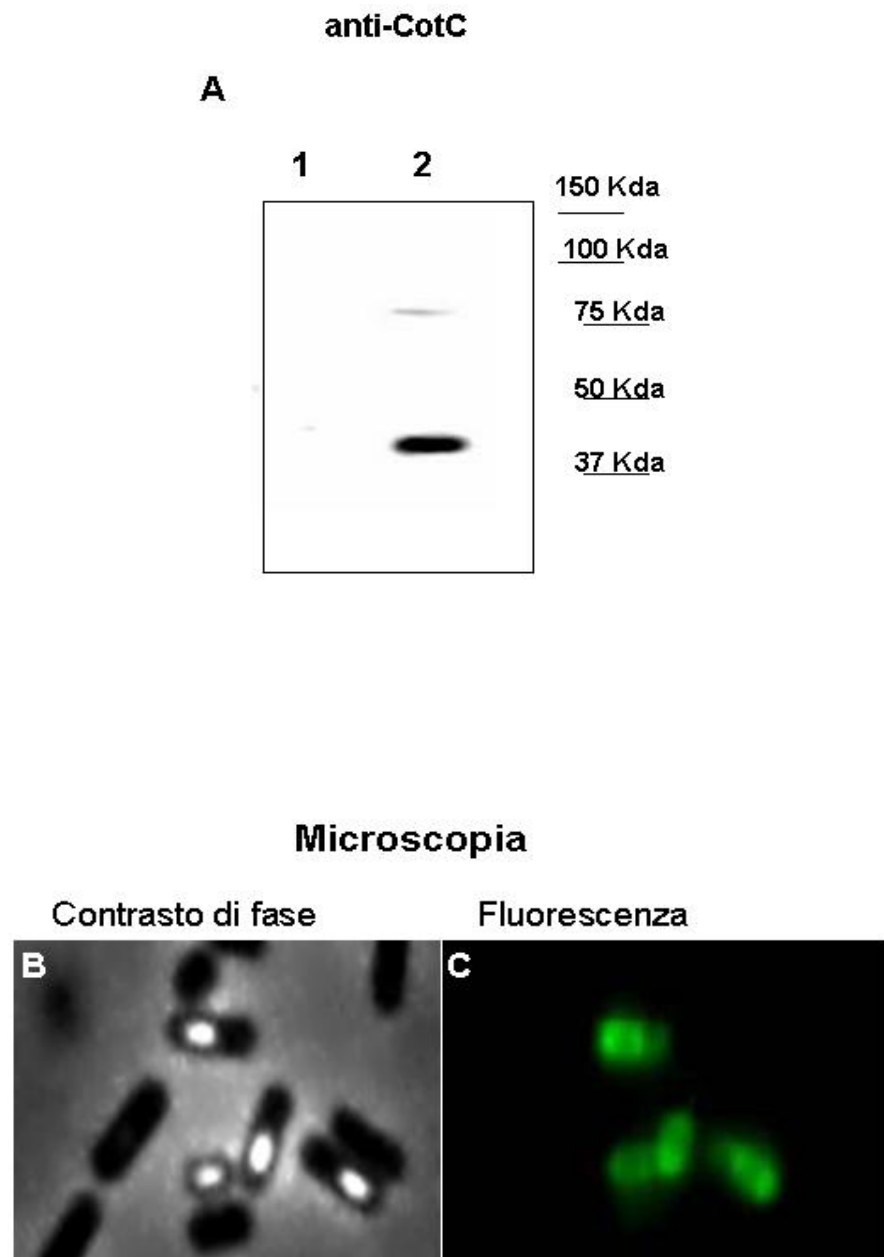


Figura.8. (A) *Western blot* con anticorpo anti-CotC di proteine estratte dalle spore del ceppo RH209 (*cotU::neo cotC::spc*) (lane 1) e del ceppo isogenico DS127 (*cotC::gfp*) (lane 2). (B e C). Localizzazione della proteina CotC-GFP. Lo stesso campo viene mostrato al contrasto di fase (B) e al microscopio a fluorescenza (C).

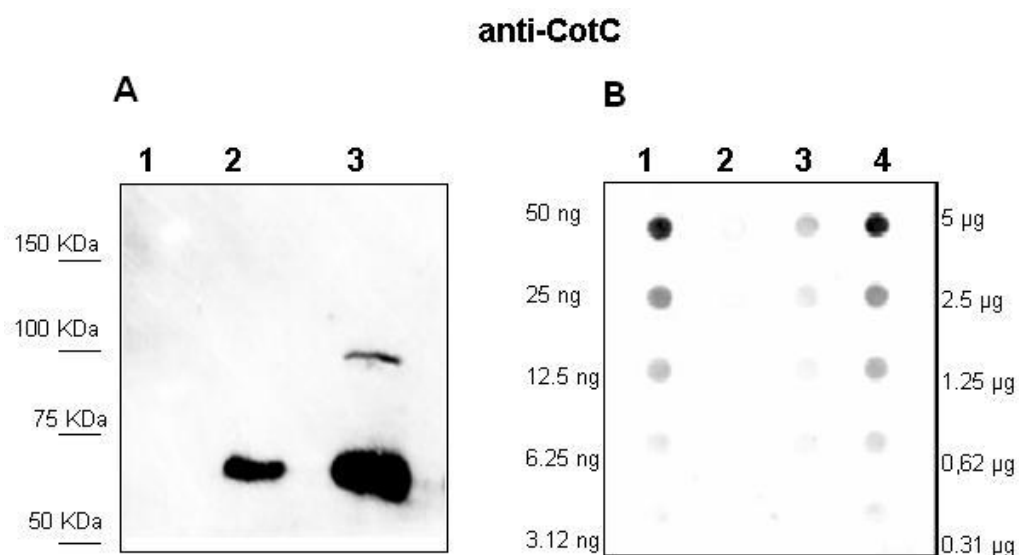
GFP. La proteina di 80 KDa, anch'essa riconosciuta dall'anticorpo anti-CotC, corrisponde a quella attesa per la forma dimerica di CotC-GFP.

Le spore CotC-GFP sono state anche analizzate per microscopia a fluorescenza. I pannelli B e C della fig. 8 mostrano lo stesso campo osservato al contrasto di fase (B) e per microscopio a fluorescenza (C). La fluorescenza non appare associata alle cellule vegetative ma specifica delle spore ed localizzata solo intorno ad esse, come già riportato per altri componenti della tunica sporale (van Ooij .et al., 2004).

3.1.4 Valutazione dell'efficienza di esposizione del sistema

Per valutare l'efficienza di esposizione del nuovo sistema, ho costruito una fusione, (come descritto nel paragrafo 3.1.2), inserendo, all' N-terminale di CotC TTFC, già precedentemente utilizzato per costruire la fusione al C-terminale dello stesso partner di fusione. Ho così potuto comparare l'efficienza di esposizione delle due fusioni.

A tale scopo, estraevo le proteine dalle spore purificate dei ceppi DS124 (CotC-TTFC N-term), DS125 (tab. 6) (CotC-TTFC C-term) e RH209 e le analizzavo con esperimenti di *western blot* e *dot blot* (fig.9) con anticorpo anti-CotC. Come mostra la fig. 9 (pannello A), tra le proteine estratte dalle spore del ceppo DS124 era evidente la presenza di due segnali specifici approssimativamente di 60 e 120 KDa, mentre tra le proteine delle spore DS125 l'anticorpo anti-CotC riconosceva un'unica e



C

	Quantità di proteina usata (ng)	Densità (OD / mm ²) ^a	ng di CotC-TTFC in estratto (% totale) ^b
CotC purificato	25	8.19 (± 0.03)	N.A. ^c
	12.5	3.35 (± 0.02)	N.A. ^c
	6.25	1.89 (± 0.01)	N.A. ^c
Coat proteins estratte dal ceppo DS125 (C-term)	5000	4.04 (± 0.02)	14.70 (0.29)
	2500	1.87 (± 0.01)	7.51 (0.30)
	1250	0.91 (± 0.01)	3.72 (0.29)
Coat proteins estratte dal ceppo DS124(N-term)	2500	9.52 (± 0.03)	40.20 (1.60)
	1250	4.99 (± 0.02)	21.00 (1.53)
	625	2.57 (± 0.01)	9.30 (1.49)

^a La densità veniva misurata come OD/mm² al Gel Doc (BioRad) usando il software Multianalyst. ^b Valori calcolati dai segnali in OD/mm² ottenuti con le concentrazioni note di CotC. ^c N.A. indica non applicabile.

Figura 9. (A) *Western blot* con anticorpo anti-CotC di proteine estratte dalle spore del ceppo RH209 (*cotU::neo cotC::spc*) (lane 1) e del ceppo isogenico DS125 (*cotU::neo cotC::spc cotC::tetC* C-term) (lane 2) e DS124 (*cotU::neo cotC::spc cotC::tetC* N-term) (lane 3). (B) *Dot blot* con anticorpo anti-CotC di proteine estratte dalle spore del ceppo RH209 (lane 2) e del ceppo DS125 (lane 3) e DS124 (lane 3). Come standard è stata utilizzata la proteina CotC purificata (lane 1). (C) Analisi densitometrica del *dot blot*.

meno abbondante proteina di circa 60 KDa. Poiché TTFC è una proteina di 51 KDa (Isticato et al., 2001; Mauriello et al., 2004), la proteina a 60 KDa corrispondeva al peso molecolare atteso per la proteina di fusione CotC-TTFC. La proteina a 120 KDa, riconosciuta dall'anticorpo anti-CotC, corrispondeva, invece, alla forma dimerica della proteina CotC-TTFC.

Una determinazione quantitativa della fusione CotC-TTFC esposta sulle spore DS124 e DS125 era ottenuta con esperimenti di *dot blot*. (fig.9 pannello B.). L'analisi densitometrica del *dot blot* indicava che, mentre la fusione CotC-TTFC al C-terminale rappresenta lo 0,3% delle proteine estratte dalla tunica, la fusione CotC-TTFC all' N-terminale è 5 volte più abbondante (fig.9 pannello C). In base a studi precedenti (Isticato et al., 2001), che riportano che circa 9.7×10^7 molecole di CotC-TTFC vengono estratte da ogni spora del ceppo DS125 (Mauriello et al., 2004), calcolavo che circa 4.8×10^3 molecole di CotC-TTFC venivano estratte da ogni spora del ceppo DS124.

Analizzavo le spore CotC-TTFC anche con esperimenti di immunofluorescenza. La fig. 10 mostra uno stesso campo osservato a contrasto di fase (pannello A) e con microscopia a fluorescenza (pannello B). Come nel caso di CotC-GFP, la fluorescenza era concentrata esclusivamente intorno alla spora. L'accessibilità della proteina chimerica da parte degli anticorpi primario e secondario

utilizzati per gli esperimenti di immunofluorescenza indicava che la proteina di fusione CotC-TTFC è anche esposta sulla superficie sporale. I ceppi DS127 e DS124, contenenti rispettivamente le fusioni CotC-GFP e CotC-TTFC, producevano spore indistinguibili da quelle selvatiche sia per quel che riguarda il profilo morfologico e le proprietà di rifrangenza osservabili al microscopio ottico, sia per quel che riguarda la resistenza al calore, al trattamento con il lisozima e l'efficienza di germinazione (dati non mostrati), tutti parametri indicativi della formazione di una tunica sporale normale.

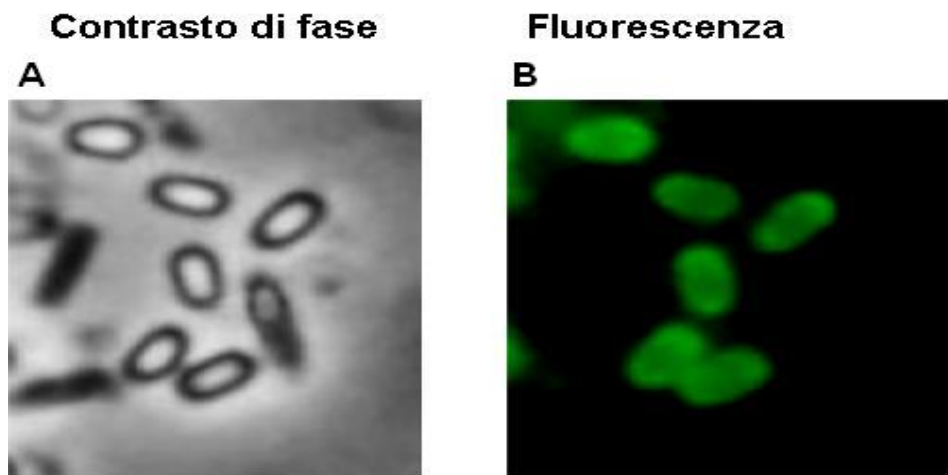


Figura 10 :Localizzazione della fusione CotC-TTFC per immunofluorescenza.
Lo stesso campo viene mostrato al contrasto di fase (A) e al microscopio a fluorescenza (B).

DISCUSSIONE

I sistemi di esposizione di molecole eterologhe rappresentano un potente strumento biologico con svariate applicazioni nella messa a punto di vaccini, nel trattamento di infezioni microbiche, nello screening di librerie di peptidi e nello sviluppo di biocatalizzatori o biosensori (Richins et al., 1997; Sthal et al., 1997). Diversi approcci per esporre proteine eterologhe sulla superficie di cellule batteriche o di fagi sono stati sviluppati ed ampiamente analizzati (Lee et al., 1997).

Relativamente recente è la messa a punto di una strategia di ingegnerizzazione di spore batteriche, in particolare di endospore di *Bacillus subtilis*, per ottenere l'esposizione di antigeni (Isticato et al., 2001) o di enzimi (Kim et al., 2005) sulla superficie sporale.

Rispetto ai sistemi basati sull'uso dei fagi o di cellule batteriche, quello basato sulla spora presenta diversi vantaggi, compresi l'alta stabilità e la non patogenicità per l'uomo. L'uso commerciale di spore di varie specie di *Bacillus* come probiotici o per la profilassi orale di disordini del tratto gastrointestinale dimostra chiaramente come le spore di queste specie non siano dannose per la salute dell'organismo umano (Senesi et al., 2004; Hong et al., 2005).

La possibilità di esprimere molecole bioattive sulla superficie delle spore di *Bacillus subtilis*, dove l'efficienza di display è associata con le

proprietà di resistenza delle spore, ha spostato l'attenzione di molti studiosi su questo sistema in modo da utilizzarlo per l'esposizione di antigeni ed enzimi con rilevanza in campo farmaceutico o industriale (Isticato et al; 2004).

Il sistema di espressione di proteine eterologhe sulla superficie sporale consiste: i) nella costruzione di una fusione genica tra il DNA codificante per un componente della tunica sporale che funge da “carrier” e DNA eterologo codificante per la proteina da esporre sulla superficie sporale; ii) nell'espressione della fusione sotto il controllo di segnali trascrizionali e traduzionali specifici per il gene codificante per la proteina carrier, in modo da mantenere inalterata la sequenza spazio-temporale dell'espressione; iii) nell'integrazione della fusione genica sul cromosoma di *B. subtilis* in modo da assicurarne la stabilità genetica.

Con il mio lavoro di tesi, ho messo a punto il sistema di display basato sulla spora ottimizzando l'uso di CotC come partner di fusione. CotC è una delle proteine più abbondanti della tunica sporale ed è stata precedentemente utilizzata per l'esposizione di antigeni eterologhi (Mauriello et al., 2004).

Per ottimizzare il sistema di espressione sulla spora, ho utilizzato la regione N-terminale della proteina CotC poichè fusioni geniche al C-terminale di CotC non consentono un corretto ed efficiente assemblaggio delle proteine ricombinanti sulla superficie sporale.

Ho, quindi, costruito un vettore che consente l'inserzione di DNA eterologo tra il promotore e la regione codificante del gene *cotC* e che permette l'integrazione delle fusioni sul cromosoma di *B. subtilis*.

La strategia messa a punto presenta un'efficienza di display circa 5 volte superiore rispetto alle precedenti procedure (Mauriello et al., 2004) e, usando un ceppo di *B. subtilis* che non contiene altre copie del gene *cotC*, permette un riconoscimento diretto da parte dell'anticorpo anti-CotC dell'antigene esposto senza dover ricorrere, di volta in volta, all'uso di un anticorpo antigene-specifico .

Ho validato l'uso di questo nuovo sistema basato su CotC utilizzando un peptide di soli 6 amminoacidi (6xHis-tag) e la proteina GFP (Green Fluorescent Protein) di 27 KDa mentre, per valutare l'efficienza di display del sistema, ho utilizzato la proteina TTFC (frammento C-terminale della tossina tetanica di *Clostridium tetanii*) di 51 KDa, già precedentemente utilizzata per costruire la fusione al C-terminale di CotC. Gli alti livelli di espressione osservati con queste due proteine suggeriscono che il sistema di esposizione basato sulla spora rappresenta un'utile strategia per esporre molecole eterologhe di svariate dimensioni e si pone come una valida alternativa ai sistemi basati sull'uso di cellule o fagi per la progettazione di vaccini e di biosensori o di bioreattori ad alte prestazioni.

Paragrafo 3.2

D'Apice et al., 2007. *Vaccine*. 25:1993-2000

I risultati descritti qui di seguito sono stati oggetto di una pubblicazione (D'Apice et al., 2007) qui allegata e riportano un'analisi comparativa sull'immonogenicità di tre diversi vettori di vaccinazione sviluppata in collaborazione con il gruppo di ricerca del dott. Piergiuseppe De Berardinis (C.N.R., Napoli).

La ricerca di vaccini nuovi e sicuri rappresenta oggi uno dei principali strumenti con cui la scienza vuole arginare la diffusione di molte malattie. In questo contesto si inserisce il mio lavoro di Tesi mirato allo sviluppo di un innovativo sistema di esposizione di antigeni eterologhi come base per la formulazione di vaccini sempre più efficaci ed economici.

In questa parte del mio lavoro di Tesi decidevo di confrontare l'efficienza di tre diversi approcci per la produzione di nuovi veicoli di vaccinazione. A tale scopo gli stessi epitopi venivano presentati dal:

- i) batteriofago filamentoso fd,
- ii) l'enzima E2 di *Bacillus stearothermophilus*,
- iii) la spora di *Bacillus subtilis*.

Questi *carriers* hanno in comune alcune caratteristiche, quali la non patogenicità per l'uomo e l'animale e la capacità di indurre una risposta immunitaria, sia di tipo cellulare sia di tipo umorale, specifica per il

determinante antigenico veicolato (De Berardinis et al., 2000; Duc et al., 2003).

Il sistema di presentazione basato sul fago filamentoso fd si basa sulla tecnologia del *phage display* per cui è possibile inserire diverse copie del determinante antigenico nella regione N-terminale di una delle proteine più abbondanti presenti nel capsido virale (De Berardinis et al., 1999).

La proteina E2 è un componente del complesso multienzimatico 2-oxo-acido deidrogenasi di *Bacillus stearothermophilus*. Il sistema di presentazione basato su E2 permette di esporre fino a 60 copie di polipeptidi eterologhi sulla superficie della proteina E2 (Domingo et al., 2001).

La spora di *Bacillus subtilis* è stata precedentemente utilizzata con successo per l'esposizione di antigeni eterologhi, usando, in particolare, come partner di fusione sia la proteina CotC sia la proteina CotB. I dati riportati in letteratura dimostrano che circa 1500 copie di proteina ricombinante possono essere presenti sulla superficie di una spora senza provocarne perdita di funzionalità (Mauriello et al., 2004; Isticko et al., 2001; Duc et al., 2003).

Condizione essenziale affinché un vaccino stimoli un'immunizzazione specifica, durevole ed efficace da parte dell'organismo è la capacità di indurre sia una risposta umorale, con la produzione di anticorpi da parte delle cellule B, che cellulare, con l'attivazione di cellule CD8⁺ T

citotossiche (CTL) . Un ruolo cruciale nell'attivazione sia delle cellule B che delle cellule T è svolto dai linfociti T-helper CD4+. Recenti studi hanno, infatti, enfatizzato l'importanza delle cellule CD4+ durante il processo d'infezione (Klenerman et al., 2005). Le cellule T CD4+ cooperano con le cellule dendritiche (DC) nell'attivazione delle cellule T CD8+ ed hanno una funzione critica ma ancora poco nota nel promuovere e conservare la “memoria” dei linfociti CD8+. Inoltre, le cellule CD4+ possono anche avere una funzione regolatoria sulle cellule T determinando qualità, quantità, tempo di rigenerazione e distribuzione delle sub-popolazioni cellulari coinvolte nella risposta immunitaria. Le cellule CD4+ riconoscono epitopi composti da peptidi lunghi 10-18 amminoacidi complessati con una molecola MHC II (*Major Histocompatibility Complex II*).

In questo studio, due determinanti antigenici specifici per le cellule CD4+ e corrispondenti, rispettivamente, ai residui amminoacidici 249-263 (peptide 23) della trascrittasi inversa (RT) del virus HIV-1 e 191-205 della proteina gp120 (peptide 24) del capsido virale del virus HIV-1 sono stati espressi sulla superficie dei sistemi di presentazione sopra indicati. Inoltre, lo stesso peptide (pep23) è stato selezionato per l'espressione all'N-terminale della proteina GST (Glutadione-S-Trasferasi) di *Schistosoma japonicum*.

Di seguito sono riportati gli studi mirati a valutare l'antigenicità e l'immunogenicità degli epitopi selezionati veicolati dai diversi *carriers* e, inoltre, viene riportata un'analisi sviluppata su cellule di ibridoma, stimulate con i vari sistemi di display, volta a determinare la presenza del TCR (*T Cell Receptor*) antigene-specifico.

3.2.1 Espressione dell'epitopo CD4+ in differenti sistemi di display

Tre diversi sistemi di presentazione sono stati utilizzati per esporre gli stessi epitopi virali e per valutarne la rispettiva efficacia nell'indurre una specifica risposta immunitaria di tipo T-helper.

In fig.11 viene riportata una rappresentazione schematica dei tre sistemi di presentazione che esprimono i peptidi antigenici selezionati.

Il core E2 del complesso della piruvato deidrogenasi di *B. stearothermophilus* forma uno scaffold di 20 trimeri di molecole E2 che si dispongono a simmetria icosaedrica. Ingegnerizzando il core E2, è possibile esporre fino a 60 copie di peptidi antigenici su uno scaffold ad alto peso molecolare (1.5 MDa) (Domingo et al., 2001).

La proteina pVIII rappresenta il principale componente strutturale del capsido del batteriofago fd dove è presente in 2700 copie e si dispone secondo una struttura tubulare che avvolge il genoma virale costituito da un singolo filamento a DNA. In batteriofagi ibridi fd23 o fd24, circa il 10 % delle proteine pVIII espone gli epitopi pep23 o pep24 posizionati

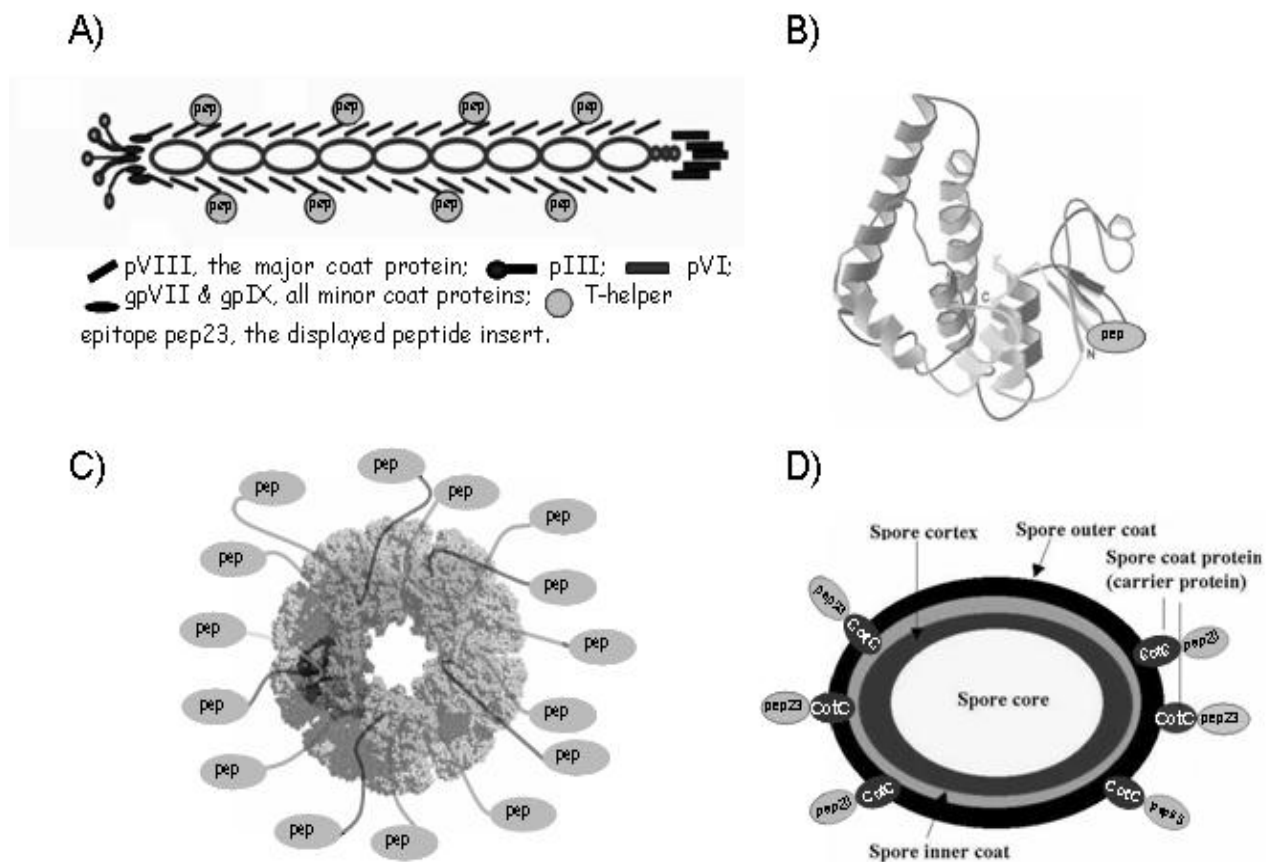


Figura 11. Rappresentazione schematica dei sistemi di veicolazione dell'antigene. (A) Batteriofago ibrido che esprime in superficie gli epitopi alla regione N-terminale della principale proteina del capsido, pVIII. (B) Costrutto GST ricombinante esprime i peptidi antigenici all'N-terminale della proteina Glutadione-S-trasferasi. (C). Lo scaffold E2 derivato dal complesso piruvato deidrogenasi di *B. stearothermophilus* che espone i peptidi antigenici all'N-terminale del core E2. (D). Spore di *B. subtilis* esprimenti pep23 fuso all'N-terminale della proteina del rivestimento sporale CotC.

nella regione N-terminale, tra i residui +3 e +4 della proteina di rivestimento matura.

In questo studio, come nel precedente (paragrafo 3.1), per ottenere l'esposizione sulla superficie della spora di *B. subtilis* del pep23 è stata utilizzata la proteina CotC. Il DNA codificante per il pep23 è stato quindi inserito nella regione del gene *cotC* compresa tra il promotore del gene e la sua regione codificante *in-frame* con il sito d'inizio della traduzione, conservando inalterati i segnali trascrizionali e traduzionali del gene. La proteina di fusione CotC-pep23 rappresenta oltre il 10 % delle proteine totali estratte dalle spore tramite trattamento alcalino.

3.2.2 Analisi dell'antigenicità

Allo scopo di determinare l'antigenicità dei diversi carriers che espongono il pep23 abbiamo utilizzato una sonda cellulare, le cui caratteristiche vengono riportate in letteratura (Caivano et al., 2001).

In questo studio (Caivano et al., 2001), viene sviluppata una metodologia per ingegnerizzare le catene α e β di un TCR (*T Cell Receptor*) umano in un ibridoma murino difettivo del TCR. L'ibridoma così ricostituito acquisisce la stessa specificità antigenica della popolazione di cellule umane T da cui derivano le catene α e β del TCR. L'ibridoma cellulare, inoltre, è in grado di crescere in maniera illimitata e generalmente non presenta significative variazioni in termini di risposta all'antigene e,

quindi, è particolarmente adatto ad essere usato come sonda in studi effettuati *in vitro* sulla specificità funzionale.

L'ibridoma cellulare utilizzato nel nostro caso è stato ricostituito con un TCR specifico per il pep23 (Caivano et al., 2001) che deriva da un clone di cellule T proveniente da un donatore sano (LDA). L'elemento di restrizione utilizzato da questo clone è HLA-DR5 (allele 1101).

La fig. 12 riporta i dati relativi alla produzione di IL-2 da parte dell'ibridoma stimolato con cellule trasformate EBV (*Epstein-Barr Virus*) autologhe. Dati simili sono stati ottenuti usando cellule EBV provenienti da altri due donatori, PDB (HLA DR 5,1) e GDP (HLA DR 5,5), anch'essi caratterizzati dall'elemento di restrizione DR5 (1101), o utilizzando cellule PBL (*Peripheral Blood Lymphoid cell*) isolate da altri tre donatori (dati non mostrati). Una risposta forte, specifica e dose dipendente è stata indotta nell'ibridoma dalle particelle ricombinanti E2pep23. Questa risposta era superiore a quella ottenuta con il peptide sintetico, usato come controllo positivo. La proteina di fusione GST-pep23, invece, induceva, a basse concentrazioni molari di epitopo pep23, solo una lieve risposta. I batteriofagi fdpep23 venivano riconosciuti soltanto a più alte concentrazioni molari di peptide (3 mM) (dati non mostrati). Ancora, lo stesso epitopo CD4+ espresso sulle spore non veniva riconosciuto. Nessuna risposta è stata osservata contro i carriers *wild-type* (dati non mostrati) mentre i *carriers* in presenza del peptide

sintetico pep23 generavano una risposta simile a quella ottenuta utilizzando il solo peptide sintetico (fig. 12).

Esperimenti di inibizione della risposta pep23-specifica sono stati effettuati utilizzando anticorpi monoclonali diretti contro le molecole HLA DQ e HLA DR. Come si può evincere dai dati riportati in fig. 12, gli anticorpi anti-HLA DR avevano un effetto inibitorio sulla risposta pep23-specifica mentre gli anticorpi anti-HLA DQ non producevano alcun effetto inibitorio. In base a studi precedenti effettuati su cellule APC (*Antigen Presenting Cell*) fissate, è noto che per una corretta presentazione dell'antigene pep23 è necessario che le particelle ricombinanti fdpep23 o E2pep23 vengano correttamente processate dalle APC (De Berardinis et al., 1999; Domingo et al., 2003). Questi studi sono stati ulteriormente confermati testando l'effetto della cloroquina, una sostanza di natura basica, sull'efficienza di presentazione dell'epitopo pep23. L'aggiunta di cloroquina, responsabile dell'inibizione del processo di proteolisi a livello endolisosomico e capace di interferire con il trasporto vescicolare, riduceva la risposta dell'ibridoma al determinante antigenico pep23 veicolato dai vari *carriers*. (fig.12).

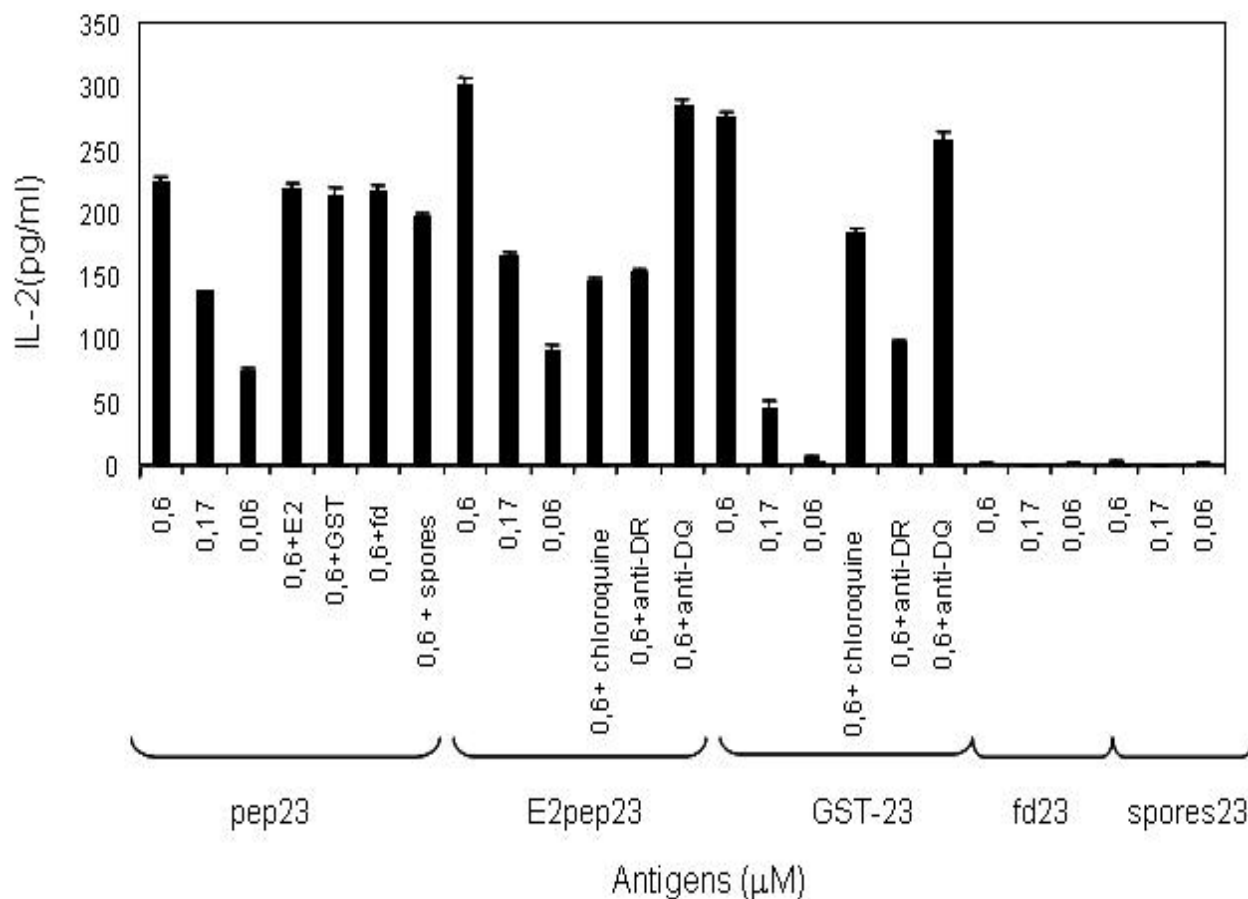


Figura 12. Produzione di IL-2 da parte dell'ibridoma T. 2×10^4 cellule hE30 di ibridoma, pep23 specifiche, venivano stimulate da 10^5 cellule HLA EBV-B di un donatore sano LDA. Le cellule EBV venivano a contatto con i differenti sistemi di display GST-23, E2pep23, fd23 o spores23, tutti esprimenti una quantità equimolare (0.06, 0.17 e 0.6 μ M) di peptide 23. L'inibizione della risposta veniva valutata in presenza di 25 μ g di anticorpi monomorfici anti-HLA DR o anti-HLA DQ, o in presenza di 50 μ M di cloroquina. La produzione di IL-2 (pg/ml) veniva valutata con saggi ELISA dopo 24 ore. I dati sono presentati come una media \pm S.D. di determinazioni in duplicato.

3.2.3 Analisi dell'immunogenicità

Le linee cellulari T utilizzate per le analisi di immunogenicità sono state ottenute stimolando le PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) provenienti dal donatore LDA con i differenti vettori di presentazione che esponevano un'identica concentrazione molare di pep23.

I risultati riportati in fig.13 (A) indicano la proliferazione delle linee cellulari T contro le diverse formulazioni di antigene.

Le curve rappresentano le risposte dose-dipendente ottenute testando le linee cellulari T in presenza di APC presentanti il peptide sintetico pep23. Le linee cellulari T derivate dalla stimolazione con le particelle E2pep23 mostravano la maggiore capacità proliferativa. Al contrario, la stimolazione con le particelle fd e GST ricombinanti inducevano solo una lieve attività di proliferazione nelle cellule T. Nessuna risposta veniva, invece, ottenuta da cellule T stimulate con le spore ricombinanti di *B. subtilis*. In questo caso, le colture cellulari venivano effettuate in presenza dell'antibiotico ampicillina (100 µg/ml) per evitare la germinazione delle spore.

In fig. 13 (A) viene anche riportata la curva dose-dipendente relativa alle cellule T stimulate con il peptide 23 sintetico. I dati ottenuti in questo caso erano simili ai valori ottenuti per cellule T stimulate in presenza sia dei carriers wild-type che del peptide sintetico (dati non mostrati), suggerendo, così, che i veicoli di presentazione dell'antigene utilizzati

per le nostre analisi non influenzano la risposta pep23-specifica delle cellule T .

Infine, per rendere i risultati più generalmente applicabili, abbiamo generato un'ulteriore linea cellulare T a partire dalle PBMC di un secondo donatore sano utilizzando i sistemi di presentazione fd, E2 e GST esprimenti ciascuno il peptide antigenico pep24. Da uno studio precedente al nostro (Caivano et al., 2001), è noto che questo peptide viene riconosciuto dalle cellule T ottenute dallo stesso donatore ad una concentrazione molare compresa tra 6 e 60 μ M, pertanto, nei successivi esperimenti è stato rispettato questo intervallo di concentrazioni.

Poiché nelle analisi sinora descritte il sistema della spora ricombinante non veniva riconosciuto, per la successiva serie di test non sono state utilizzate spore esprimenti il pep24. I risultati illustrati in fig.13(B) mostrano chiaramente che, come nel caso del peptide 23, la risposta maggiore da parte delle cellule T si aveva quando queste venivano stimulate con le particelle ricombinanti E2-pep24.

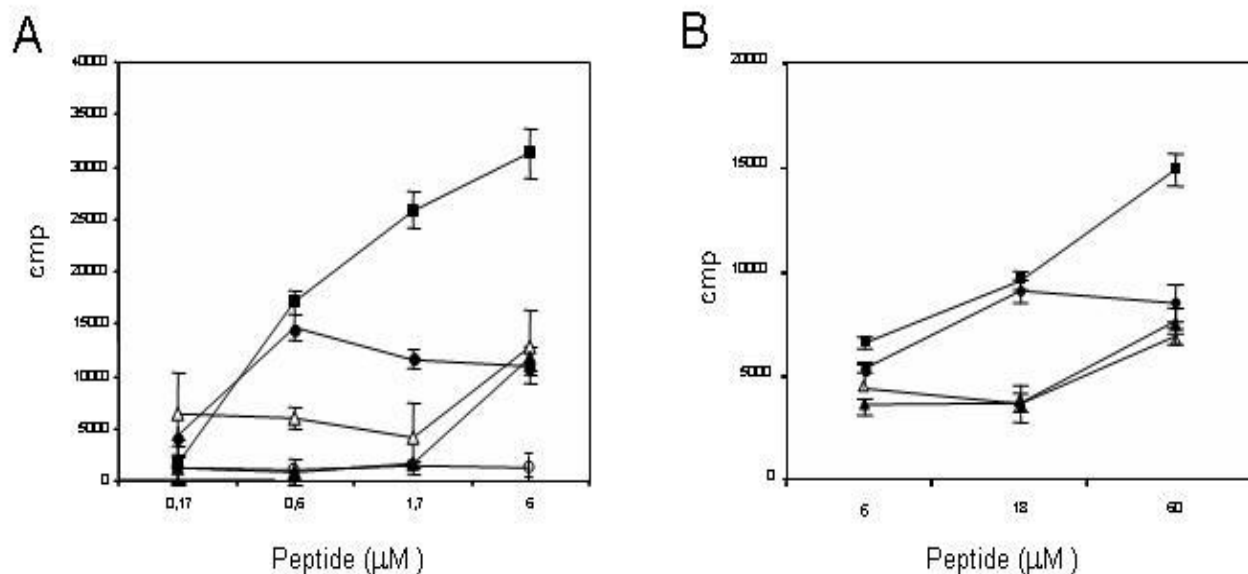


Figura 13. Riconoscimento del determinante antigenico da parte delle linee cellulari T. (A) Linee cellulari T indotte dal priming con (quadrati pieni) E2pep23, (triangoli pieni) GST-23, (triangoli vuoti) fd23, (cerchi vuoti) spore di *B. subtilis* esprimenti il pep23, (cerchi pieni) peptide 23 sintetico. (B). Analogamente, linee cellulari T venivano indotte dal priming con (quadrati pieni) E2pep24, (triangoli vuoti) fd24, (quadrati vuoti) GST-24, (cerchi pieni) peptide 24 sintetico. Cellule B linfoblastoidi EBV autologhe (1×10^5 cellule/pozzetto), prepulsate con il pep23 (A) o pep24 (B) sintetici a differenti concentrazioni indicate in ascissa, venivano usate per la presentazione dell'epitopo. Queste cellule venivano piastrate in triplicato con 2×10^4 cellule/pozzetto di diverse linee cellulari T. Dopo 36 h di incubazione $1 \mu\text{C}$ di timidina triziata veniva aggiunta ad ogni pozzetto. È riportata la risposta proliferativa (incorporazione di timidina ^3H) dei linfociti T \pm S.D..

3.2.4 Analisi clonotipica sulle linee cellulari T

Per effettuare un'analisi clonotipica sulle linee cellulari T reattive al peptide 23 si allestivano esperimenti di *Real Time PCR*, utilizzando *primers* specifici per le regioni α e β del CDR3 (*Complementary Determining Region 3*). Queste analisi indicavano l'espansione di un clonotipo identico ad uno precedentemente descritto in un clone di cellule T CD4 utilizzato per ricostituire l'ibridoma cellulare.

Questo clonotipo non veniva, invece, riscontrato nelle PBMC. Un dato interessante era che questo clonotipo, appartenente alla famiglia V β 2, è stato precedentemente identificato in una linea cellulare T indotta stimolando nell'anno 1999 le PBMC dello stesso donatore (Caivano et al., 2001). Questa osservazione indicava, così, la persistenza nel tempo dello stesso clone.

La fig. 14 mostra la presenza del clonotipo nelle linee cellulari T ottenute stimolando con i diversi carriers. I dati sono espressi come percentuale del clonotipo relativo al repertorio della famiglia V β 2. I risultati indicano che le colture cellulari, stimulate con le particelle E2, presentavano la maggiore espansione del clonotipo specifico per l'antigene pep23. Questi dati, inoltre, indicano che esiste una correlazione tra la percentuale di espressione del clonotipo e la capacità proliferativa delle linee cellulari T in risposta al *challenge* antigene-specifico.

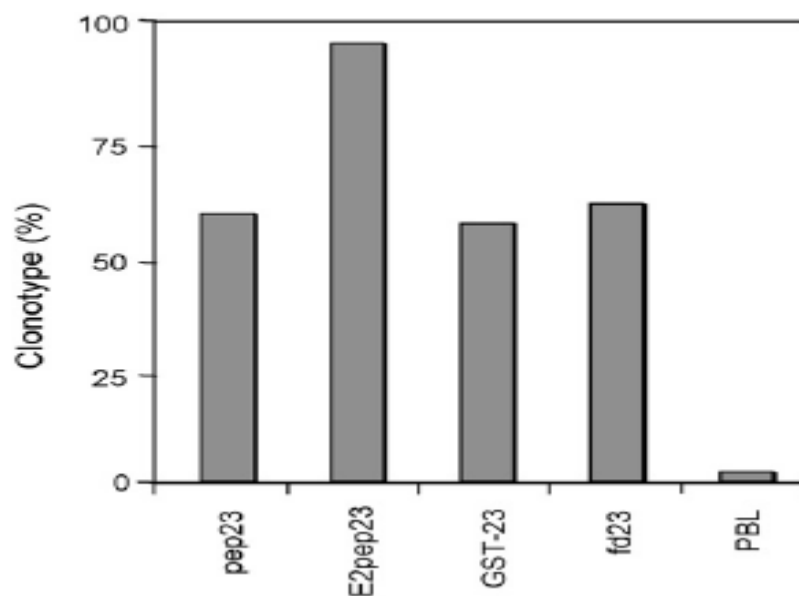


Figura 14. Frequenza del clonotipo pep23-specifico. Viene riportata la frequenza degli mRNA codificanti per il clonotipo pep23-specifico in relazione con gli mRNA dell'intero repertorio della famiglia V β 2 per le differenti linee cellulari T indicate. Il clonotipo non è riscontrabile nelle cellule PBMC , come atteso dalla bassa frequenza di linfociti T specifici.

DISCUSSIONE

Un parametro fondamentale nella formulazione di un vaccino è la progettazione di appropriati vettori di presentazione dell'antigene capaci di indurre una potente e specifica risposta immunitaria nei confronti degli epitopi selezionati. Tuttavia, pochi sono gli studi sino ad oggi effettuati per comparare la capacità dei diversi carriers di indurre una risposta immunitaria in un sistema modello. Inoltre, è noto che formulazioni antigeniche efficaci dovrebbero essere in grado di evocare i differenti meccanismi dell'immunità, in modo da aumentare il loro effettivo valore protettivo. Per questo motivo, è anche fondamentale mettere a confronto l'abilità di diversi sistemi di presentazione dell'antigene nel dirigere preferenzialmente le reazioni del sistema immunitario a determinati epitopi. In studi precedenti (De Berardinis et al., 1999; Domingo et al., 2003), è stato dimostrato che il batteriofago filamentoso fd e la proteina *scaffold* diidrolipoil-acetiltrasferasi E2 possono efficientemente presentare epitopi B e T alle rispettive cellule bersaglio e innescare una risposta immunitaria sia di tipo umorale sia di tipo cellulare. Infatti, le particelle fd ed E2, una volta internalizzate, possono raggiungere i compartimenti MHC sia di classe I sia di classe II, permettendo, così, il corretto processamento dell'antigene veicolato e una sua efficiente presentazione (Gaubin et al., 2003; Wan et al., 2005).

Con il mio lavoro di Tesi, sviluppato in collaborazione con il gruppo di ricerca del dott. P. De Berardinis (C.N.R. di Napoli), ho comparato l'immunogenicità dei sistemi fd e E2 con la spora di *B.subtilis* e la proteina di fusione GST.

I nostri studi *in vitro* prima descritti miravano a definire l'antigenicità e l'immunogenicità di un epitopo per cellule T CD4+, caratterizzato già in precedenza (Caivano et al.,2001), che veniva veicolato dai diversi sistemi di display. I dati sull'antigenicità, ottenuti analizzando lo specifico riconoscimento del peptide da parte di un ibridoma T, indicavano che l'epitopo CD4 veniva efficientemente riconosciuto solo se veicolato dalle particelle E2. Diversi sono i vantaggi connessi all'uso di particelle E2 come sistema di presentazione rispetto ad altre formulazioni antigeniche. Innanzitutto, E2 può recuperare la sua forma nativa *in vitro* formando un 60-mero a simmetria icosaedrica senza l'intervento di chaperonine (Domingo et al., 2001). Questa proprietà potrebbe essere correlata all'alta termostabilità tipica di molte proteine presenti in *Bacillus stearothermophilus*. Un efficiente processo di *refolding* di E2 avviene anche quando peptidi eterologhi vengono inseriti nel core E2 per costruire fusioni all'N-terminale. È possibile, così, ottenere un core E2 ingegnerizzato, (E2DISP), inserendo fino a 60 copie di antigeni eterologhi sulla superficie di uno *scaffold* ad alto peso molecolare. Inoltre, il display all'N-terminale di particelle E2 non

presenta alcuna limitazione di dimensioni, permettendo l'esposizione non solo di peptidi di piccole dimensioni ma anche di intere proteine . In *Bacillus stearothermophilus*, il sistema E2 presenta fino a 60 copie degli enzimi E1 (150 KDa) o E3 (100 KDa), legati non covalentemente alla sua superficie, per cui, E2 si presta come un naturale partner di fusione per proteine di elevate dimensioni. La Green Fluorescent Protein (GFP); che ha un peso molecolare di circa 27KDa, è stata infatti utilizzata con successo per l'esposizione all'N-terminale di E2 (Domingo et al., 2001). Nelle nostre condizioni sperimentali l'epitopo CD4 non veniva riconosciuto se espresso sulla superficie della spora di *Bacillus subtilis*. È noto che l'uso di spore ricombinanti può offrire numerosi vantaggi. Queste particolari forme cellulari vengono diffusamente utilizzate come integratori alimentari e trovano anche svariate applicazioni in campo farmaceutico, ovviando al problema della sicurezza connesso alla produzione di massa dei vaccini. Studi precedenti effettuati *in vivo* (Mauriello et al., 2004; Duc t al., 2003) propongono l'uso della spora come valido e potente sistema di esposizione dell'antigene in pratiche di immunizzazione mucosale.

In questo lavoro, abbiamo riscontrato la persistenza di un clonotipo su cellule T reattive al determinante antigenico. Questo clonotipo antigene-specifico era stato già identificato nell'anno 1999 in una linea cellulare T proveniente dallo stesso donatore (Caivano et al., 2001).

Questi dati sulla persistenza nel tempo di un clone CD4 T antigene-specifico sono concordanti con risultati già pubblicati (Li Pira et al., 2005).

Un dato interessante riscontrato in questo lavoro è che esiste una stretta correlazione tra la presenza di questo clonotipo nelle linee cellulari T e la sensibilità delle stesse al determinante antigenico. Ciò indica che il sistema di presentazione E2 è in grado di attivare uno specifico clonotipo di TCR e di definire il repertorio di cellule T.

Recenti studi hanno caratterizzato il restringimento del repertorio di linfociti T indotto da carriers eterologhi (Cornberg et al., 2006). Da un lato, tale selettività può consentire a patogeni mutanti di eludere il sistema immunitario (Cornberg et al., 2006) (Dong et al., 2004). Dall'altro lato, questi studi dimostrano che il successo di una terapia è strettamente correlato alla selettività del repertorio di recettori T e che la presenza di specifici clonotipi rappresenta un requisito fondamentale per innescare le difese immunitarie (Nicholson et al., 1990; Cornberg et al., 2006).

In questo contesto i nostri risultati mostrano una correlazione tra la presenza di uno specifico clonotipo e l'intensità della risposta antigene-specifica.

In conclusione, da questa analisi *in vitro* dei sistemi di display innovativi, si evince che l'enzima E2 di *B. stearothermophilus*

rappresenta un ottimo sistema per la presentazione di epitopi specifici per cellule T-helper CD4+. L'attivazione delle cellule CD4+ risulta fondamentale nell'attivazione della difesa immunitaria alle infezioni da parte di diversi organismi patogeni (Klenerman et al., 2005). Inoltre, l'identificazione di un sistema di presentazione dell'antigene che sia in grado di evocare specifiche armi del sistema immune è un parametro chiave per la progettazione di vaccini.

Rimane da chiarire la differenza di risposta ottenuta con il sistema di esposizione sulla spora in esperimenti *in vivo* (Duc et al., 2003, Mauriello et al., 2004, Mauriello et al., 2007) e quelli *in vitro* qui riportati. Una possibile spiegazione può essere trovata nelle dimensioni delle molecole eterologhe utilizzate, infatti mentre negli studi *in vivo* le spore espongono antigeni batterici di oltre 100 e oltre 400 residui aminoacidici, in questo studio *in vitro* le spore espongono epitopi virali di soli 15 amminoacidi. E' ipotizzabile che in una struttura complessa come la spora epitopi di piccole dimensioni possano risultare "mascherati" dalla presenza di un enorme numero di altre molecole proteiche che normalmente formano il rivestimento esterno della spora.

Paragrafo 3.3

L'infezione da *Hepatitis C Virus* (HCV) è la causa principale di gravi patologie del fegato, come l'epatite cronica, la cirrosi epatica e il carcinoma epatocellulare (HCC) e colpisce un numero elevatissimo di persone, pari a circa 170 milioni, in tutto il mondo. Ancora oggi non esiste vaccino o terapia che abbia effettivamente un potere protettivo da questo virus (Moradpour et al., 2007). Il trattamento terapeutico attualmente adottato, che consiste nella somministrazione di interferone- α (IFN- α) in combinazione con la ribavirina, si rivela fallimentare contro la maggior parte dei genotipi virali (Inchauspe and Feinstone, 2003). A causa dell'alta variabilità genetica del virus la progettazione di un efficace vaccino contro l'HCV è diventata, quindi, un'operazione estremamente difficile che, negli ultimi anni, ha attirato l'attenzione di un numero sempre maggiore di studiosi.

In questo contesto si inseriscono gli esperimenti descritti in questo capitolo della mia Tesi, volti a verificare l'applicazione delle spore di *Bacillus subtilis* come vettori di vaccinazione, con l'esposizione in superficie di un antigene derivante dal virus HCV. Decidevo di selezionare come antigene virale modello la proteina NS3 (*Nonstructural 3*). Il genoma dell'HCV codifica per una singola poliproteina che viene processata, ad opera di proteasi virali e cellulari, per generare 10 polipeptidi (Penin et al., 2004). Questi polipeptidi vanno a costituire o il capsido o il *core* o la regione non strutturale (*Nonstructural region*) del

virus, quest'ultima comprendente proteine fondamentali per la replicazione (figura 15). In particolare, la proteina NS3, di 631 amminoacidi e massa molecolare di circa 70 KDa, presenta un dominio N-terminale con funzione di proteasi ed un dominio C-terminale che funge da RNA elicasi/NTPasi (Dubuisson, 2007). L'attività proteasica di NS3 è responsabile del processamento della poliproteina ed è inoltre necessaria a generare i componenti del complesso di replicazione dell'RNA virale.

Ed è proprio per il ruolo cruciale svolto nella replicazione del virus che questa proteina rappresenta il primo *target* nello sviluppo di nuovi farmaci anti-HCV (Dubuisson, 2007).

Recenti studi hanno inoltre dimostrato che la regione NS3 di HCV rappresenterebbe un valido candidato immunogeno grazie al fatto che la sua sequenza risulta conservata in differenti genotipi virali (Capone et al., 2006). I primi tentativi nella messa a punto di nuovi vaccini anti-HCV hanno utilizzato, come sistema di presentazione della proteina NS3, dei vettori adenovirali che, somministrati in topi BALB/c e in scimpanzè, hanno prodotto significative risposte immunitarie di tipo cellulare (Capone et al., 2006).

Il sistema di presentazione che ho utilizzato per la proteina NS3 consiste, invece, nella spora di *B. subtilis*. Per ottenere l'espressione di NS3 sulla superficie sporale selezionavo come *partner* di fusione due componenti

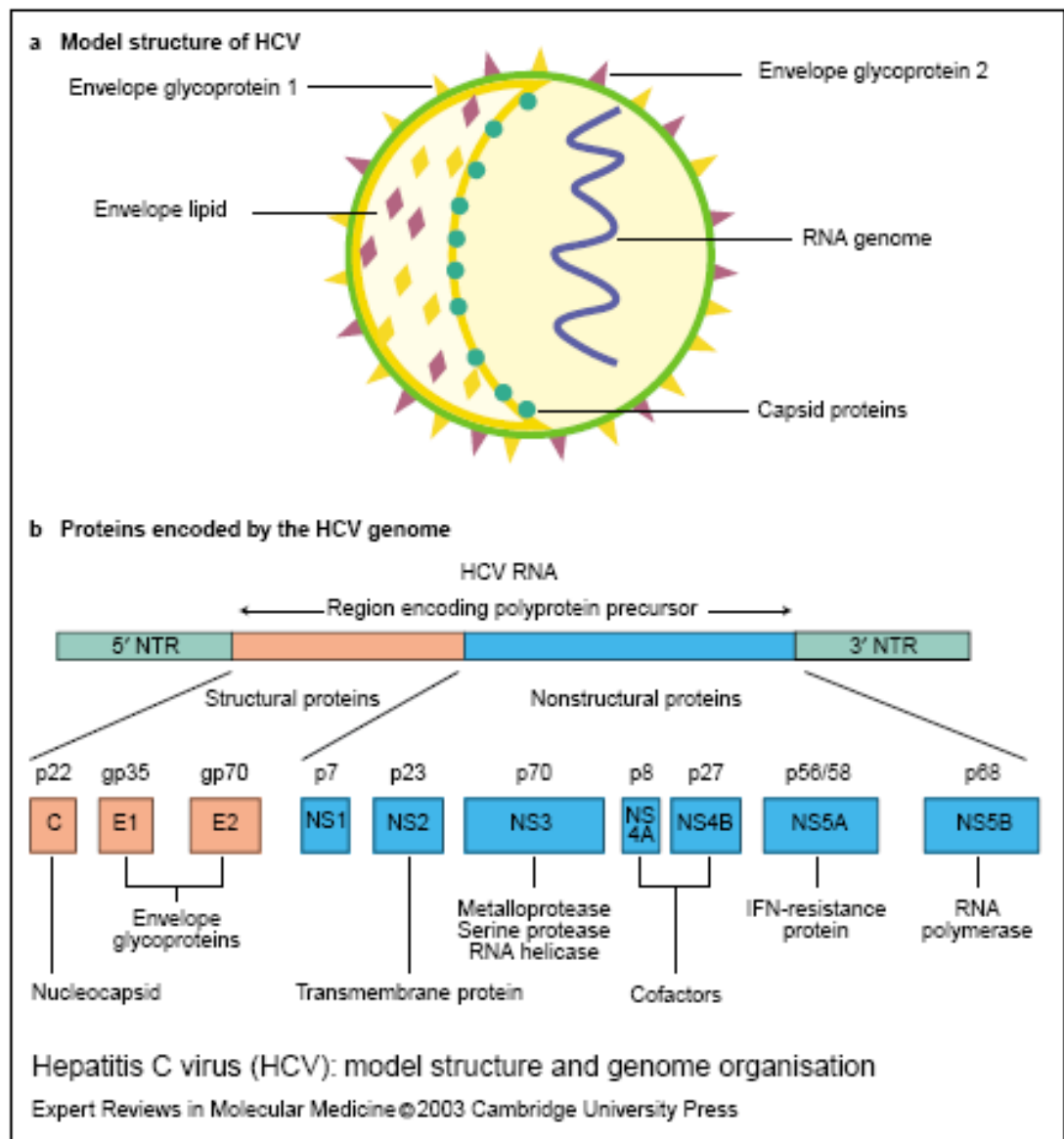


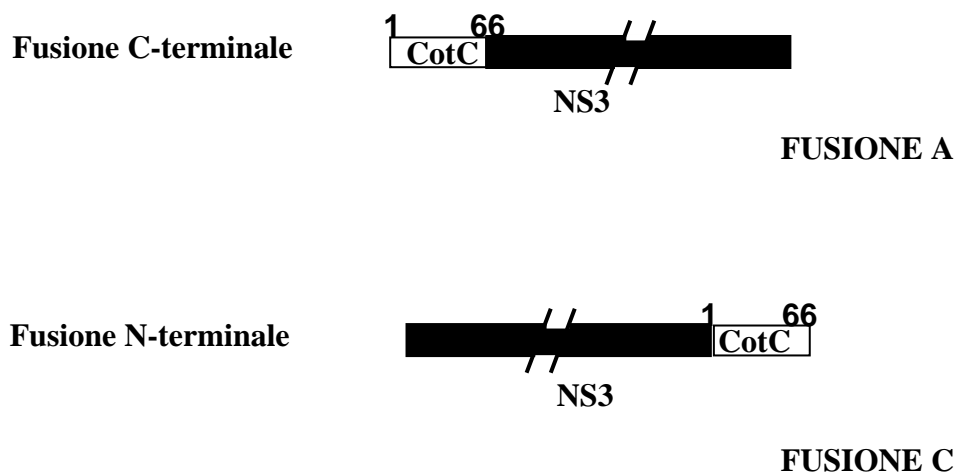
Figura 15. Virus dell'epatite C (HCV): schema della struttura e della organizzazione del genoma. (a) Struttura modello dell'HCV. Sulla sinistra dell'illustrazione sono indicati i lipidi e le glicoproteine della superficie virale. Sulla destra viene mostrato l'RNA genomico avvolto da proteine del capside. (b). Proteine codificate dal genoma di HCV. Il genoma è costituito da un filamento positivo di 9.6 Kb e comprende una lunga *open reading frame* codificante per una poliproteina di 3010 aa. che viene tagliata durante e dopo la traduzione da proteasi virali e cellulari in 10 differenti prodotti, con le proteine strutturali (C) C, core, E1 e E2 localizzate all'N-terminale e le proteine replicative (NS2-5) nella parte restante. Sono riportate in basso le putative funzioni dei prodotti della proteolisi.

della tunica sporale, CotB e CotC, già precedentemente utilizzati per esporre, rispettivamente, TTFC (Isticato et al., 2001) e TTFC e LTB (Mauriello et al., 2004). In particolare, tenendo conto che il posizionamento della molecola *passenger* all'interno di una fusione genica è fondamentale per non interferire con la stabilità e la funzionalità della proteina ricombinante (Isticato et al., 2004), decidevo di costruire 3 fusioni geniche inserendo NS3:

- iv) al C-terminale della proteina CotC (FUSIONE A);
- v) al C-terminale della proteina CotB Δ_{105} (FUSIONE B);
- vi) all'N-terminale della proteina CotC (FUSIONE C).

La strategia generale che ho seguito per ottenere l'espressione eterologa sulla superficie sporale consisteva nel legare il 5' della sequenza codificante per NS3 all'estremità 3' di: i) il gene *cotC* con il suo promotore (FUSIONE A), ii) un frammento del gene *cotB* di 1.071 bp contenente il promotore del gene e codificante per i primi 275 aminoacidi di CotB (Fusione B) e iii) nell'inserire la sequenza codificante per NS3 nella regione compresa tra il promotore e il coding del gene *cotC*, *in-frame* con il sito d'inizio della traduzione (FUSIONE C). Tali fusioni geniche venivano successivamente clonate in un vettore integrativo e quindi trasferite sul cromosoma di *B. subtilis* in seguito ad un evento di doppia ricombinazione per garantirne la stabilità genetica.

CotC come partner di fusione



CotB come partner di fusione

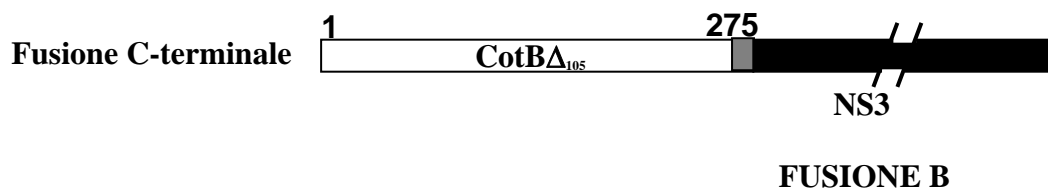


Figura 16. Rappresentazione schematica delle fusioni A, B e C. Le cassette nere rappresentano la proteina NS3 di 631 amminoacidi. Le cassette bianche indicano il partner di fusione, CotC, per le fusioni A e C e la forma deleta del gene CotB (275 amminoacidi), CotB Δ_{105} , per la fusione B (Isticato et al., 2001).

Esperimenti per valutare l'espressione eterologa sulle spore dei ceppi ricombinanti così ottenuti sono, al momento della stesura di questa Tesi, ancora in corso.

3.3.1 Costruzione delle fusioni geniche.

Per ottenere le tre fusioni A, B e C (fig.16) utilizzavo la tecnica della *Polymerase Chain Reaction* (PCR). I geni *cotB* e *cotC* venivano amplificati per PCR usando come stampo il cromosoma di *B. subtilis* e come primers gli oligonucleotidi sintetici riportati in tabella 7.

Fusione A. Il frammento di 363 bp corrispondente al gene *cotC* veniva ottenuto per amplificazione da DNA cromosomale di *B.subtilis*, con gli oligonucleotidi CotC-HindIIIsenso e CotC-EcoRV-anti (tab.7). Il prodotto di PCR veniva purificato e clonato nel plasmide pGemT-easy ed il plasmide ricombinante così originato, veniva chiamato pHC2.

Il frammento di 1896 bp corrispondente alla sequenza codificante per NS3 veniva separatamente amplificato dal plasmide pMRKAd6 (Capone et al., 2006) con gli oligonucleotidi NS5-EcoRVsenso e NS3-EcoRI/SpeI anti (tab.7). Il prodotto di PCR veniva purificato e clonato nel plasmide pGemT-easy ed il plasmide ricombinante ottenuto veniva chiamato pHC3. Il frammento NS3 veniva escisso dal plasmide pHC3 mediante digestione con gli enzimi *EcoRV* e *SpeI* e clonato in pHC2

precedentemente digerito con gli stessi enzimi. Il costrutto così creato veniva chiamato pHc5.

Fusione B. La strategia seguita per ottenere la fusione B era identica a quella seguita per costruire la fusione A, con le seguenti modifiche: il frammento di 1.071 bp corrispondente al gene *cotB* veniva ottenuto per amplificazione da DNA cromosomale di *B.subtilis*, con gli oligonucleotidi CotB-HindIIIsenso e CotB-EcoRV-anti (tab.7). Il prodotto di PCR veniva purificato e clonato nel plasmide pGemT-easy ed il plasmide ricombinante così originato, veniva chiamato pHc1.

Il frammento NS3 veniva escisso dal plasmide pHc3 mediante digestione con gli enzimi *EcoRV* e *SpeI* e clonato in pHc1 precedentemente digerito con gli stessi enzimi. Il plasmide così ottenuto veniva chiamato pHc4.

Fusione C. Il frammento di 1896 bp corrispondente alla sequenza codificante per NS3 veniva amplificato dal plasmide pMRKAd6 (Capone et al., 2006) con gli oligonucleotidi NS5-NotI senso e NS3-NotI anti (tab.7). Il prodotto di PCR veniva purificato e clonato nel plasmide pGemT-easy, ottenendo il plasmide ricombinante pHc6. La fusione del frammento NS3 con il gene *cotC* veniva ottenuta utilizzando il vettore pDS17 (Isticato, Scotto Di Mase et al., 2007).

I plasmidi ricombinanti ottenuti, pHc4, pHc5 e pHc6, venivano sottoposti a sequenza nucleotidica con il metodo di Sanger (Sambrook et

al., 1989), allo scopo di verificare che le fusioni geniche avessero mantenuto una corretta *open reading frame*.

3.3.2 Integrazione cromosomale delle fusioni geniche.

Le fusioni geniche A e B venivano escisse rispettivamente dai plasmidi pHc5 e pHc4 mediante digestione con gli enzimi di restrizione *HindIII* e *EcoRI*, purificate da gel d'agarosio e trasferite ciascuna nel vettore d'integrazione pDG364 precedentemente digerito con gli stessi enzimi di restrizione, ottenendo, rispettivamente, i vettori pHc8 e pHc9. pDG364 presenta come marcatore selezionabile in *B.subtilis* il gene per la resistenza all'antibiotico cloramfenicolo (*cat*) inserito, insieme ad un *polycloning site*, tra due regioni del gene non essenziale *amyE* di *B. subtilis* (Cutting & Vander Horn , 1990) chiamate *amy-front* e *amy-back*.

La fusione genica C veniva ottenuta escindendo il frammento NS3 dal plasmide pHc6 mediante digestione con l'enzima di restrizione *NotI*, purificata da gel d'agarosio e trasferita nel vettore pDS17, precedentemente digerito con lo stesso enzima di restrizione. Ottenevo il plasmide pHc7.

Per integrare le fusioni geniche sul cromosoma di *B. subtilis*, i plasmidi pHc7, pHc8 e pHc9 venivano linearizzati per digestione con l'enzima di restrizione *KpnI* (fig. 17) ed utilizzati per trasformare cellule di un

ceppo selvatico di *B. subtilis* (PY79) rese competenti come descritto in Materiali e Metodi.

I cloni resistenti al cloramfenicolo erano il prodotto di un evento di doppio *crossing-over* tra le regioni del gene *amyE* presenti sui plasmidi ricombinanti e quelle presenti sul cromosoma .

Per verificare che le integrazioni dei plasmidi pH7, pH8 e pH9 sul cromosoma fossero effettivamente avvenute come previsto, estraevo il DNA cromosomale di alcuni cloni Cm^R e lo utilizzavo come stampo in reazioni di PCR, con gli oligonucleotidi interni al gene *amyE*: AmyA (5'-CGAGAAGCTATCACCGCCCAGC-3', +2128/+2150) e AmyS (5'-CCAATGAGGTTAAGAGTATTCC-3', +569/+590). I cloni derivati dalla trasformazione con i plasmidi pH7, pH8 mostravano, come atteso, un prodotto di amplificazione delle dimensioni di 5710 bp, mentre i cloni derivati dalla trasformazione con il plasmide pH9 mostravano un prodotto di amplificazione delle dimensioni attese di 6401 bp. Tre cloni positivi, uno per ogni trasformazione, chiamati HC101, HC102 e HC100 e contenenti rispettivamente le fusioni A, B e C, venivano selezionati per gli esperimenti successivi.

3.3.3 Analisi morfologica delle spore

Allo scopo di comparare dal punto di vista morfologico le spore dei ceppi mutanti e con quelle del ceppo *wt*, coltivavo le cellule del ceppo

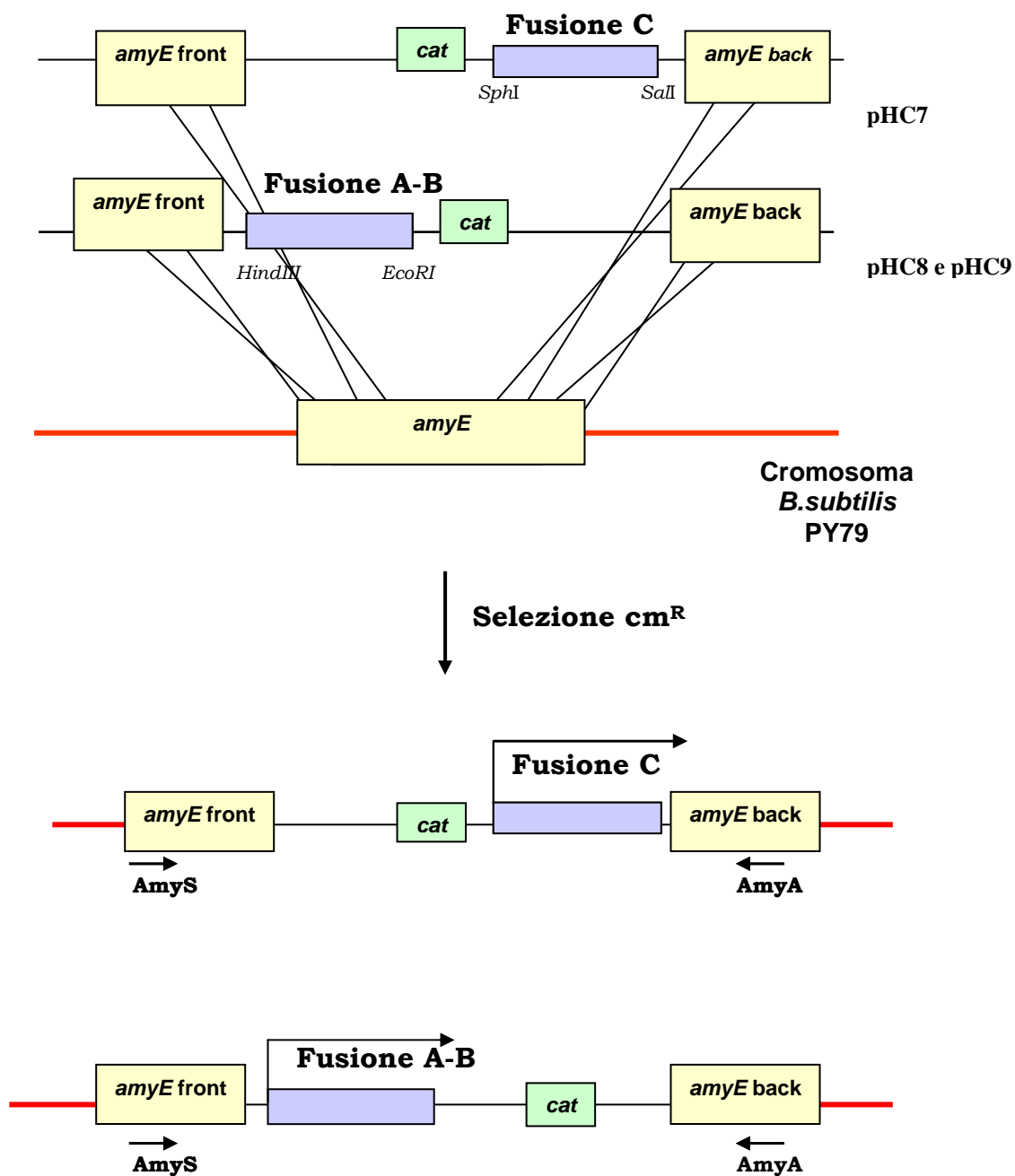


Figura 17: Schema di integrazione dei plasmidi ricombinanti pHC7, pHC8 e pHC9 contenenti rispettivamente le fusioni C, A, B per doppio *crossing-over* sul cromosoma di *B. subtilis*. Sono indicati gli oligonucleotidi AmyS ed AmyA utilizzati per verificare mediante PCR la corretta integrazione delle fusioni.

selvatico parentale PY79 e dei ceppi ricombinanti in terreno DSM per indurre la sporulazione. Dopo 24 ore di incubazione a 37°C in condizioni aerobiche, raccoglievo le spore e le analizzavo al microscopio ottico. Queste spore apparivano indistinguibili da quelle selvatiche sia per quel che riguarda il profilo morfologico e le proprietà di rifrangenza osservabili al microscopio ottico.

3.3.4 Prospettive future

Le proteine estratte dalle spore dei ceppi ricombinanti HC100, HC101 e HC102 verranno analizzate con i seguenti esperimenti:

- i) analisi di *western blot*, per verificare che le fusioni proteiche siano correttamente espresse e assemblate sul rivestimento sporale;
- ii) analisi di *dot blot*, per determinare la quantità di proteina ricombinante eventualmente espressa sulla superficie delle spore.

Le spore HC100, HC101 e HC102 saranno, inoltre, utilizzate per:

- iii) esperimenti di immunofluorescenza, in modo da verificare che la proteina di fusione sia esposta sul rivestimento sporale, e per
- iv) esperimenti *in vivo* in un sistema murino, in modo da valutarne la risposta immunitaria (in collaborazione con il gruppo di ricerca della ditta Okàiros del C.E.I.N.G.E. di Napoli).

DISCUSSIONE

I programmi internazionali di immunizzazione hanno ottenuto notevoli successi permettendo, almeno nei paesi industrializzati, una forte riduzione della mortalità e dell'incidenza di malattie un tempo molto diffuse, quali il vaiolo e la poliomielite.

Nonostante ciò, la recente ricomparsa di malattie che nel mondo occidentale sembravano eradicate e la scarsa diffusione di programmi di vaccinazione nei paesi in via di sviluppo, hanno creato negli ultimi anni la necessità di dare un forte impulso agli studi per sperimentare nuovi farmaci e nuovi vettori di esposizione di antigeni eterologhi.

Sono stati proposti vari sistemi di presentazione di antigeni, come, ad esempio, 1) i microrganismi patogeni; 2) i microrganismi non patogeni; 3) le particelle inerti non vitali, come i liposomi e le nanoparticelle, 4) i vettori a DNA. Tuttavia, nessuno dei sistemi di veicolazione di antigeni finora messi a punto è risultato pienamente soddisfacente, rendendo quindi necessaria l'introduzione di nuovi sistemi in grado di superare le difficoltà fino ad ora incontrate.

Alcune caratteristiche delle spore batteriche, come la non patogenicità, l'alta stabilità ed i bassi costi di produzione, rendono la spora un potenziale candidato come sistema di presentazione antigenica e quindi per lo sviluppo di nuovi vaccini sicuri ed economici.

E' stata recentemente verificata (Isticato et al., 2001) la possibilità di utilizzare le spore di *B. subtilis* come vettore per la veicolazione e presentazione di antigeni eterologhi a livello delle mucose. Allo scopo è stato utilizzato un componente strutturale del rivestimento esterno della spora (CotB) come *partner* di fusione per l'esposizione superficiale del frammento C-terminale della tossina tetanica (TTFC), codificato dal gene *tetC* di *Clostridium tetani*.

In successivi esperimenti è stato utilizzato un altro componente strutturale della tunica sporale di *B. subtilis*, la proteina CotC, per ottenere spore ricombinanti che esprimessero in superficie TTFC o la subunità B della tossina labile al calore di *Escherichia coli* (LTB), di dimensioni molecolari inferiori rispetto a TTFC (Mauriello et al., 2004).

Con il mio lavoro di Tesi, mi sono prefissa gli obiettivi di: i) verificare la flessibilità della spora come sistema di presentazione di un antigene eterologo diverso sia per la natura virale sia per le dimensioni molecolari maggiori rispetto a quelli precedentemente utilizzati; ii) verificare l'applicazione delle spore come vettori di vaccinazione.

A tale scopo ho costruito tre diverse fusioni geniche posizionando la proteina NS3, un antigene derivante dalla regione non strutturale del virus HCV (*Hepatitis C Virus*) al C-terminale di CotB, all' N-terminale e al C-terminale di CotC. Tali fusioni geniche venivano quindi integrate sul cromosoma di un ceppo di *B. subtilis*. Le spore dei ceppi

ricombinanti così ottenuti verranno successivamente analizzati per verificare la corretta espressione delle proteine eterologhe sulla superficie e per valutarne il potere immunogenico in un modello murino.

4. Discussione

L'impiego di microrganismi ricombinanti che presentano molecole eterologhe in superficie ha attirato, negli ultimi anni, moltissimo interesse poiché questo tipo di ricerca racchiude in sé potenzialità immense e, ad oggi, ancora in parte inesplorate, in differenti aree, come la biotecnologia, la microbiologia e la biomedicina (Gergiou et al., 1997). L'applicazione più comune riguarda l'area della vaccinologia, per cui è generalmente diffuso l'uso di microrganismi ricombinanti come vettori di vaccinazione mucosale. Attualmente, però, anche altre aree applicative, come la biocatalisi, la tecnologia a biosensori, e le tecnologie di *library screening*, stanno attirando l'interesse della comunità scientifica e molto attivi sono gli studi sulla possibilità di utilizzare virus o sistemi procariotici Gram positivi o Gram negativi per questo tipo di applicazioni (Samuelson et al., 2002).

Per diversi motivi pratici, il sistema Gram positivo ha delle proprietà che lo rendono particolarmente adatto per svariate applicazioni biotecnologiche. Innanzitutto, l'esposizione in superficie di proteine eterologhe in batteri Gram positivi sembra non avere limitazioni riguardo alle dimensioni molecolari (Fischetti et al., 1996) e al processo di trasporto e “montaggio” della proteina ricombinante sulla superficie cellulare, cosa che invece nei batteri Gram negativi richiede numerosi passaggi.

Accanto alle opportunità offerte dalla manipolazione di cellule batteriche per il *display* superficiale, ci sono però anche alcuni fattori che ne limitano le potenzialità, come, ad esempio, i rischi connessi all'uso di specie batteriche patogene o l'instabilità del sistema di espressione eterologa in batteri non patogeni. Per superare queste difficoltà, è stata messa a punto una tecnologia innovativa che si basa su un sistema di esposizione alternativo: la spora batterica e, in particolare, la spora di *Bacillus subtilis*. Il sistema di *display* basato sulla spora di *B. subtilis* presenta numerosi vantaggi rispetto agli altri sistemi basati su cellule batteriche, come l'economicità, la semplicità di produzione e purificazione, la non patogenicità e la stabilità genetica. I primi tentativi per ottenere l'espressione eterologa in questo sistema sono stati effettuati utilizzando, come motivo di ancoraggio alla superficie, delle proteine presenti sullo strato più esterno del rivestimento sporale (tunica). In particolare, le proteine CotB e CotC sono state selezionate per esporre sulla spora il frammento C-terminale della tossina tetanica (TTFC), codificato dal gene *tetC* di *Clostridium tetani* (Isticato et al., 2001) e, nel caso di CotC, anche la subunità B della tossina labile al calore di *Escherichia coli* (LTB), di dimensioni molecolari inferiori rispetto a TTFC (Mauriello et al., 2004). La validità di questa tecnologia è stata comprovata anche da esperimenti *in vivo*, in cui spore ricombinanti somministrate per via orale ad un modello murino erano in grado di

generare specifiche risposte immunitarie sia mucosali sia sistemiche (Isticato et al., 2001; Mauriello et al., 2004).

Ancora un'altra proteina della tunica sporale, CotG, è stata selezionata per ottenere l'esposizione in superficie di enzimi eterologhi che presentano attività enzimatiche di particolare interesse nel campo industriale, come nel caso della β -Galattosidasi di *Escherichia coli* (Kwon et al., 2007).

Date le vaste potenzialità nell'area biotecnologia di questo sistema, diventa una possibilità davvero intrigante quella di poterne ottimizzare la resa, in modo da ridurne al minimo i costi e i tempi di preparazione.

In questo contesto si inserisce il mio lavoro di Tesi, volto ad ottimizzare l'uso di spore bioingegnerizzate come vettori di esposizione di antigeni eterologhi e a confermare positivamente il loro uso come veicoli di vaccinazione. Quindi, con il mio lavoro di tesi mi sono prefissa gli obiettivi di: i) ottimizzare l'uso di CotC come *partner* di fusione; ii) di effettuare un'analisi comparativa *in vitro* tra diversi vettori di *display* procariotici e iii) verificare l'applicazione delle spore come vettori di vaccinazione, con l'esposizione di un antigene eterologo di origine virale. i) Per ottimizzare il sistema di *display* basato sulla spora, selezionavo la proteina CotC, uno dei componenti più abbondanti presenti sullo strato esterno della tunica sporale (Zheng et al., 1988).

Ho, quindi, costruito, un vettore che consente l'inserzione di DNA eterologo tra il promotore e la regione codificante del gene *cotC* e che permette l'integrazione delle fusioni sul cromosoma di *B. subtilis*.

Ho validato l'uso di questo nuovo vettore basato su CotC utilizzando un peptide di soli 6 amminoacidi (6xHis-tag) e la proteina GFP (Green Fluorescent Protein) di 27 KDa mentre, per valutare l'efficienza di *display* del sistema, ho utilizzato la proteina TTFC (frammento C-terminale della tossina tetanica) di 51 KDa. La strategia messa a punto presenta un'efficienza di *display* circa 5 volte superiore rispetto alle precedenti procedure (Mauriello et al., 2004), suggerendo che il sistema della spora può essere applicato per l'esposizione di molecole eterologhe con svariate dimensioni molecolari e funzioni, di enzima, di biosensore o di immunogeno (Isticato, Scotto Di Mase et al., 2007).

ii) Allo scopo di effettuare un'analisi comparativa *in vitro* di diversi vettori di vaccinazione di origine procariotica selezionavo il peptide 23 (pep23) di soli 15 amminoacidi, derivante dal virus HIV-1 (*Human Immunodeficiency virus-I*). Questo epitopo veniva presentato da:

- i) batteriofago filamentoso fd,
- ii) l'enzima E2 di *Bacillus stearothermophilus*,
- iii) la spora di *Bacillus subtilis*.

Il potere immunogenico di ciascuno dei vettori presentanti è stato saggiando usando come sonda un ibridoma T murino. In questo studio,

condotto *in vitro*, l'ibridoma riconosceva il peptide antigenico (pep23) solo se veicolato dalle particelle E2 (D'Apice et al., 2007). Nel caso dei fagi (fdpep23) o delle spore-pep23, l'ibridoma non dava nessuna risposta. Come spiegato prima, è noto che spore di *B.subtilis* sono in grado di generare, *in vivo*, significative risposte immunitarie specifiche per il determinante antigenico veicolato (Duc et al., 2003; Isticato et al., 2001). Probabilmente, la non reattività della spora riscontrata *in vitro* nel sistema ibridoma si spiega con la complessità strutturale che solo una vera e propria forma cellulare, come la spora, può avere. L'insieme vasto delle proteine che formano il rivestimento sporale potrebbe, in qualche modo, aver "nascosto" l'epitopo, composto da soli 15 aa, alla sonda usata in questo studio. iii) Per confermare ulteriormente l'applicazione delle spore come vettori di vaccinazione, utilizzavo due proteine della tunica, CotB e CotC, per esporre un antigene virale di dimensioni molecolari maggiori rispetto a quelli precedentemente utilizzati. Come antigene modello selezionavo la proteina NS3, derivante dal virus HCV (*Hepatitis C Virus*), in quanto NS3 rappresenta l'ideale bersaglio per lo sviluppo di nuovi farmaci anti-HCV, grazie al suo ruolo cruciale svolto nel ciclo infettivo del virus (Capone et al., 2006; Dubuisson et al., 2007). Per esporre NS3 sulla superficie sporale, ho costruito delle fusioni geniche basandomi su CotC e CotB come strutture di ancoraggio. Le fusioni geniche NS3-CotB e NS3-CotC venivano

quindi integrate sul cromosoma di un ceppo di *B. subtilis*. L'analisi dell'espressione eterologa sulle spore dei ceppi ricombinanti così ottenuti è, al momento della stesura di questa Tesi, ancora in corso.

I risultati presentati in questa Tesi rappresentano una conferma ma anche un nuovo e promettente punto di partenza nella ottimizzazione del sistema di presentazione di antigeni basato su spore di *B. subtilis*, che si pone come una valida alternativa ai sistemi finora provati per la progettazione di vaccini, biosensori o biocatalizzatori ad alte prestazioni.

5. Bibliografia

Aronson, AI., Ekanayake, L., Fitz-James, PC. 1992. Protein filaments may initiate the assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *Biochimie* 74: 661-67

Baccigalupi, L., Castaldo, G., Cangiano, G., Isticato, R., Marasco, R., De Felice, M. and Ricca, E. 2004. GerE-independent expression of *cotH* leads to CotC accumulation in the mother cell compartment during *Bacillus subtilis* sporulation. *Microbiol UK* 150:3441-3449.

Bae, W., Chen, W., Mulchandani, A., Mehra R. 2000. Enhanced bioaccumulation of heavy metals by bacterial cells displaying synthetic phytochelators. *Biotechnol Bioeng* 70:518-524.

Bae, W., Mehra, R., Mulchandani, A., Chen, W. 2001. Genetic engineering of *Escherichia coli* for enhanced uptake and bioaccumulation of mercury. *Appl Environ Microbiol* 67:5335–5338

Bae, W., Mulchandani, A., Chen, W. 2002. Cell surface display of synthetic phytochelators using ice nucleation protein for enhanced heavy metal bioaccumulation. *J Inorg Biochem* 88:223–227.

Beall, B., A. Driks, R. Losick, and C. P. Moran, Jr. 1993. Cloning and characterization of a gene required for assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *J Bacteriol* 175:1705-16.

Benhar, I. 2001. Biotechnological applications of phage and cell display. *Biotechnol. Adv.* 19:1-33

Caivano, A., D'Apice, L., Tiberio, C., Prisco, A., Acuto, O., Guardiola, J. et al. 2001. Design of cassette vectors permitting cloning of all types of human TCR variable a and b regions. *J Immunol Methods* 255(1): 125-34

Cano, F., Liljeqvist, S., Nguyen, TN., Samuelson, P., Bonnefoy, JY., Stahl, S., Robert, A. 1999. A surface-displayed cholera toxin B peptide improves antibody responses using food-grade staphylococci for mucosal subunit vaccine delivery. *FEMS Immunol Med Microbiol* 25: 289-298.

Capone S., Meola, A., Bruno, BE., Vitelli, A., Pezzanera, M., Ruggeri, L., Davies ME., et al. 2006. A novel Adenovirus Type (Ad 6)-Based Hepatitis C Virus Vector that overcomes preexisting anti-Ad5 immunity and induces potent and broad cellular immune responses in Rhesus Macaques. *J Virol* 80: 1688-1699.

- Chada, VGR., Sanstad, EA., Wang, R., Driks, A.** 2003. Morphogenesis of *Bacillus* spore surfaces. *J Bacteriol* 185: 6255-61.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C.** 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*. 263: 802-805.
- Cornberg, M., Chen, AL., Wilkinson, LA., Brehm, MA., Kim, S., Calcagno, C., et al.** 2006. Narrowed TCR repertoire and viral escape as a consequence of heterologous immunity. *J Clin Invest* 116: 1443-56
- Costa, TV., Serrano, M., Moran, CP. Jr., Henriques, AO:** 2006. The timing of *cotE* expression affects *Bacillus subtilis* spore coat morphology but not resistance to lysozyme. *J Bacteriol* 189:2401-10
- Costa, T.V., Steil, L., Martins, L. O., Völker, U., and Henriques, A. O.** 2004. Assembly of an oxalate decarboxylase produced under sigma control into the *Bacillus subtilis* spore coat. *J. Bacteriol.*, 186: 1462-1474.
- Cutting, S., Vander Horn, P.B.** 1990. Genetic analysis, p. 27-74. In C. Harwood and S. Cutting (Eds.), *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- D'Apice, L., Sartorius, R., Caivano, A., Mascolo, D., Del Pozzo, G., Scotto Di Mase, D., Ricca, E., Li Pira, G., et al.** 2007. Comparative analysis of new innovative vaccine formulations based on the use of procaryotic display systems. *Vaccine*. 25: 1993-2000.
- De Berardinis, P., D'Apice, L., Prisco, A., Ombra, MN., Barba, P., Del Pozzo, G., et al.** 1999. Recognition of HIV-derived B and T cell epitopes displayed on filamentous phages. *Vaccine*. 12 (9-10): 1177-87.
- De Berardinis, P., Haigwood, N.** 2004. New recombinant vaccines based on the use of procaryotic antigen-display systems. *Exp. Rev. Vaccines*. 3 (6): 673-767
- De Berardinis, P., Sartorius, S., Fanutti, C., Perham, RN., Guardiola, J.** 2000. Phage display of peptide epitopes from HIV-1 elicits strong cytolytic responses. *Nat Biotechnol*. 18: 873-6
- di Marzo Veronese F, Willis A E, Boyer-Thompson C, Appella E, Perham R N.** 1994. Structural mimicry and enhanced immunogenicity

of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage. The V3 loop of HIV-1 gp120. *J. Mol Biol* **243**:167-72.

Domingo, GJ., Caivano, A., Sartorius, S., Barba, P., Backstrom, M., Paitier-Tonneau, D., et al. 2003. Priming of antigen specific cytotoxic T-cell response by peptides displayed on the E2 icosahedral lattice. *Vaccine*. 21: 1502-9.

Domingo, GJ., Orru, S., Perham, RN. 2001. Multiple display of peptides and proteins on a macromolecular scaffold derived from a multienzyme complex. *J Mol Biol* 305: 259-67.

Dong, T., Steward-Jones, G., Chen, N., Easterbrook, P., Xhu, X., Papagno, L., et al. 2004. HIV – specific cytotoxic T-cells from long term survivors select a unique T-cell receptor. *J Exp Med* 200: 1243-56.

Donovan, W., Zheng, L., Sandman, K., Losick, R. 1987. Genes encoding spore coat polypeptides from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol* 196: 1-10.

Douce, G., Turcotte, C., Cropley, I., Roberts, M., Pizza, M., Domeneghini, M., Rappuoli, R., and Dougan, G. 1995. Mutants of *Escherichia coli* heat-labile toxin lacking ADP-ribosyltransferase activity act as non toxic, mucosal adjuvants. *Proc Nat Acad of Sci U.S.A.* 92:1644-1648

Driks, A. 1999. *Bacillus subtilis* spore coat. *Microbiol Mol Biol Rev* 63:1-20.

Driks, A. 2003. The dynamic spore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:3007-9.

Driks, A., S. Roels, B. Beall, C. P. Moran, Jr., and R. Losick. 1994. Subcellular localization of proteins involved in the assembly of the spore coat of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* 8:234-44.

Dubuisson, J. 2007. Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 13(17): 2406-2415

Duc le, H., Hong, H.A., Barbosa, TM., Henriques, AO., Cutting, SM. 2004. Characteritaton of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol* 70(4): 2161-71.

Duc le, H., Hong, H.A., Fairweather, N., Ricca, E., and Cutting, S.M. 2003. Intracellular fate and immunogenicity of *Bacillus subtilis* spores. *Infect. Immun.* 71: 2810-2818.

Duc le, H., Hong, H.A. and Cutting, S.M. 2003. Germination of the spore in the gastrointestinal tract provides a novel route for heterologous antigen delivery. *Vaccine.* 21: 4215-24.

Felici F, Castagnoli L, Musacchio A, Jappelli R, and Cesareni G. 1991. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. *J Mol Biol.* 222:301-10.

Felici F, Luzzago A, Monaci P, Nicosia A, Sollazzo M, and Traboni C. 1995. Peptide and protein display on the surface of filamentous bacteriophage. *Biotechnol Annu Rev.* 1:149-83.

Fischetti, V., Medaglini, D., and Pozzi, G. 1996. Gram-positive commensal bacteria for mucosal vaccine delivery. *Curr Opin Biotechnol* 7:659-666

Folgori A, Tafi R, Meola A, Felici F, Galfre G, Cortese R, Monaci P, and Nicosia A. 1994. A general strategy to identify mimotopes of pathological antigens using only random peptide libraries and human sera. *EMBO J* 13:2236-43.

Gaubin, M., Fanutti, C., Durrbach, A., Mishal, Z., De Berardinis, P., et al. 2003. Virions are taken up by antigen-presenting cells to yield peptides that reach both major histocompatibility complex class II compartment and endoplasmic reticulum. *DNA Cell Biol* 22(1): 11-18

Gergiou, G., Stathopoulos; C., Daugherty, P.S., Nayak, A.R., Iverson, B.L., and Curtiss, R. 1997. Display of herologous proteins on the surface of microorganisms: from the screening of combinatorial libraries to live recombinant vaccines. *Nat Biotechnol* 15(1):29-34.

Giomarelli, B., Maggi, T., Younson, J., Kelly, C., Pozzi, G. 2004. Expression of a functional single-chain Fv antibody on the surface of *Streptococcus gordonii*. *Mol Biotechnol* 28(2): 105-12.

Gunneriusson, E., Samuelson, P., Uhlen, M., Nygren, PA., Stahl, S. 1996. Surface display of a functional single-chain Fv antibody on staphylococci. *J Bacteriol* 178(5): 1341-6.

- Harry, E.J., Pogliano, K. and Losick, R.** 1995. Use of immunofluorescence to visualize cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177:3386-3393.
- Helting, T.B., and Zwisler, O.** 1977. Structure of tetanus toxin. I. Breakdown of the toxin molecule and discrimination between polypeptide fragments. *J. Biol. Chem.* 252: 194–198.
- Henriques, A.O., Costa, T., Martins, L.O. And Zilhao, R.** 2004. The functional architecture and assembly of the spore coat. *In: Bacterial spore formers: probiotics and emerging application* (Ricca, E., Henriques, A.O. and Cutting, S.M. Eds.). *Horizon Biosciences Press*. pag. 65-85.
- Henriques, A.O., Melsen, L.R., Moran, C.P., Jr.** 1998. Involvement of superoxide dismutase in spore coat assembly in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 180:2258-91
- Henriques, A.O., and Moran, C.P., Jr.** 2000. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. *Methods.* 20: 95-110.
- Henriques, A., and Moran, C.P., Jr.** 2007. Structure, assembly and function of the spore surface layers. *Annu Rev Microbiol* 61: 555-88
- Hong, H.A., Duc le, H., and Cutting, S.M.** 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 813-835.
- Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R.** 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene.* 77: 61-68.
- Inchauspe, G. and Feinstone, S.** 2003. Development of a hepatitis C virus vaccine. *Clin Liver Dis* 7: 243-259.
- Isticato, R., Cangiano, G., De Felice, M. and Ricca, E.** 2004. Display of Molecules on the Spore Surface. *In: Bacterial spores: New Industrial and Clinical Applications.* E. Ricca, A. O. Henriques and S. M. Cutting (eds.) *Horizon Scientific Press*
- Isticato, R., Cangiano, G., Tran, T.H., Ciabattini, A., Medaglion, D., Oggioni, M.R., De Felice, M., Pozzi, G., Ricca, E.** 2001. Surface display of recombinant proteins on *Bacillus subtilis* spores. *J. Bacteriol.* 183: 6294-6301.

Isticato, R., Esposito, G., Zilhao, R., Nolasco, S., Cangiano, G., De Felice, M., Henriques, A.O. and Ricca, E. 2004. Assembly of multiple CotC forms into the *Bacillus subtilis* spore coat. *J. Bacteriol.* 186: 1129-1135.

Isticato, R., Scotto Di Mase, D., Mauriello, E.M.F., De Felice, M., and Ricca, E. 2007. Amino terminal fusion of heterologous proteins to CotC increases display efficiencies in the *Bacillus subtilis* spore system. *Bio Techniques.* 42: 151-156.

Jenkinson, HF., Sawyer, WD., Mandelstam, J. 1981. Synthesis and order of assembly of spore coat proteins in *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* 123:1-16.

Jiang J, Abu-Shilbayeh L, and Rao VB. 1997. Display of a PorA peptide from *Neisseria meningitidis* on the bacteriophage T4 capsid surface. *Infect Immun* 65:4770-7

Kim, J.H., Hahn, M., Grabowski, P., McPherson, DC., Otte, MM., et al. 2006. The *Bacillus subtilis* spore coat protein interaction network. *Mol Microbiol* 59: 487-502.

Kim, J.H., Lee, C.S., and Kim, B. G. 2005. Spore displayed streptavidin: a live diagnostic tool in biotechnology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331:210-214.

Klenerman, P., Hill, A. 2005. T cells and viral persistence: lessons from diverse infections. *Nat Immunol* 6 (9): 873-9.

Kobayashi, K., Suzuki, S.I., Izawa, Y., Miwa, K., Yamanaka, S. 1998. Transglutaminase in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J Gen Appl Microbiol* 44: 85-91

Kobayashi, K., Kumazawa, Y., Miwa, K., Yamanaka, S. 1996. e-(g-glutamyl)lysine cross-links of spore coat proteins and transglutaminase activity in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Lett* 144: 157-60.

Kodama T, Takamatsu H, Asai K, Ogasawara N, Sadaie Y, Watabe K. 2000. Synthesis and characterization of the spore proteins of *Bacillus subtilis* YdhD, YkuD, and YkvP, which carry a motif conserved among cell wall binding proteins. *J Biochem* 128:655-663.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, AM., Alloni, G., et al. 1997. The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature*. 390: 249-56

Kwon, SJ., Jung, HC. and Pan, JG. 2007. Transgalactosylation in a water-solvent biphasic reaction system with β -galactosidase displayed on the surfaces of *Bacillus subtilis* spores. *Appl Env Microbiol* 73: 2251-2256.

Lee, S.Y., Choi, J.H., Xu, Z. 2003. Microbial cell-surface display. *Trends Biotechnol.* 21: 45-52.

Liljeqvist, S., Cano, F., Nguyen, TN., Ulhén, M., Robert, A., Stahl, S. 1999. Surface display of functional fibronectin-binding domains on *Staphylococcus carnosus*. *FEBS Lett.* 446:299-304.

Li Pira, G., Bottone, L., Ivaldi, F., Del Galdo, F., Papa, F., Accolla, R., et al. 2005. Human naive CD4 T-cell clones specific for HIV ENV persist for years in vivo in the absence of antigenic challenge. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 40: 132-9

Martins, LO., Soares, CM., Pereira, MM., Teixeira, M., Costa, T., et al. 2002. Molecular and biochemical characterization of a highly stable laccase that occurs as a structural component of the *Bacillus subtilis* endospore coat. *J Biol Chem* 277: 18849-59

Mauriello, E.M.F., Duc, L.H., Istatico, R., Cangiano, G., Hong, H.A., De Felice, M., Ricca, E., and Cutting, S.M. 2004. Display of heterologous antigens on the *Bacillus subtilis* spore coat using CotC as a fusion partner. *Vaccine*. 22: 1177-1187.

Melly, E., Genesi, PC., Gilmore, ME., Little, S., Popham, DL, et al. 2002. Analysis of the properties of spores of *Bacillus subtilis* prepared at different temperatures. *J Appl Microbiol* 92:1105-15.

Mercenier, A. 1999. Lactic acid bacteria as live vaccines. *In: Probiotics a critical review*. Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pp. 113-127.

Moir, A. 2003. Bacterial spore germination and protein mobility. *Trends Microbiol* 11: 452-54.

Moradpour, D., Penin, F. and Rice, C. 2007. Replication of hepatitis C virus. *Nature Rev Microbiol* . 5(6) 453-63.

Naclerio, G., L. Baccigalupi, R. Zilhão, M. De Felice, and E. Ricca. 1996. *Bacillus subtilis* spore coat assembly requires *cotH* gene expression. *J Bacteriol* 178:4375-80.

Nicholson, W.L. 2004. Ubiquity, longevity, and ecological roles of *Bacillus* spores. In: Bacterial spore formers: probiotics and emerging applications, , E. Ricca, A. O. Henriques and S. M. Cutting eds. Norfolk, UK, Horizon Bioscience, pp. 1-15.

Nicholson, W. L., N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh, and P. Setlow. 2000. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:548-72.

Nicholson, W.L., and Setlow, P. 1990. Sporulation, germination and outgrowth, p. 391-450. In C. Harwood and S. Cutting (Eds.), *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley and Sons, Chichester, UK.

Nguyen TN, Gourdon MH, Hansson M, Robert A, Samuelson P, Libon C, Andreoni C, Nygren PA, Binz H, Uhlen M, and Stahl S. 1995. Hydrophobicity engineering to facilitate surface display of heterologous gene products on *Staphylococcus xylosus*. *J Biotechnol* 42:207-19.

Nguyen TN, Hansson M, Stahl S, Bachi T, Robert A, Domzig W, Binz H, and Uhlen M. 1993. Cell-surface display of heterologous epitopes on *Staphylococcus xylosus* as a potential delivery system for oral vaccination. *Gene* 128:89-94

Oggioni, MR., Ciabattini, A., Cuppone, AM., Pozzi, G. 2003. *Bacillus* spores for vaccine delivery. *Vaccine* 21: 96-101.

Ozin, A. J., C. S. Samford, A. O. Henriques, and C. P. Moran, Jr. 2001. SpoVID guides SafA to the spore coat in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 183:3041-9.

Penin, F., Dubuisson, J., Rey, FA., Moradpour, D., Pawlotsky, JM. 2004. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39: 5-19.

Piggot, P. J. and Coote, J. G. 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol Rev.* 40:908-962.

- Piggot, P.J., Hilbert, D.W.** 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* 7: 579-86.
- Poirier, T.P., Kehoe, M.A., Beachey, E.H.** 1988. Protective immunity evoked by oral administration of attenuated *aroA Salmonella typhimurium* expressing cloned streptococcal M protein. *J Exp Med* 168(1): 25-32.
- Pogliano, K., Harry, E. and Losick, R.** 1995. Visualization of the subcellular location of sporulation proteins in *Bacillus subtilis* using immunofluorescence microscopy. *Mol. Microbiol.* 18:459-470.
- Pozzi, G., Wells, J.M.** 1997. Gram positive Bacteria: Vaccine vehicles for mucosal immunization. In Landes Biosciences, Georgetown, TX.
- Ragkousi, K., Eichenberger, P., van Ooji, C., Setlow, P.** 2003. Identification of a new gene essential for spore germination of *Bacillus subtilis* with Ca^{2+} dipicolinate. *J Bacteriol* 185:2315-29
- Ragkousi, K., Setlow, P.** 2004. Transglutaminase-mediated cross-linking of GerQ in the coats of *Bacillus subtilis* spores. 186: 5567-75
- Ricca, E., Baccigalupi, L., Naclerio, G. & Cutting, S.** 1997. Spore coat differentiation in *Bacillus subtilis* *Res. Microbiol.* 148, 5-9
- Richins, R.D., Kaneva, L., Mulchandani, A., and Chen, W.,** 1997. Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. *Nat. Biotechnol.* 15: 984-987.
- Roels S, Losick R.** 1995. Adjacent and divergently oriented operons under the control of the sporulation regulatory protein GerE in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 177:6263-6275.
- Sacco, M., Ricca, E., Losick, R. and Cutting, S.** 1995. An additional GerE-controlled gene encoding an abundant spore coat protein from *Bacillus subtilis*. *J of Bacteriol* 177: 372-375.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Samuelson, P., Gunneriusson, E., Nygren, P., Stahl, S.** 2002. Display of protein on bacteria. *J of Biotechnol* 96: 129-154.

Schneewind, O., Fowler, A., Faull, K.F. 1995. Structure of the cell wall anchor of surface proteins in *Staphylococcus aureus* . Science. 268:103-106.

Senesi, S. 2004. *Bacillus* spores as probiotic products for human use. In *Bacterial Spore Formers: Probiotics and Emerging Application*. Ricca, E., Henriques, A.O., and Cutting, S.M., eds. Norfolk, UK, Horizon Bioscience, pp. 131-141.

Serrano, M., Zilhao, R., Ricca, E., Ozin, A.J., Moran, CP. Jr. 1999. A *Bacillus subtilis* secreted protein with a role in endospore coat assembly and function. *J Bacteriol* 181: 3632-43

Setlow P. 2003. Spore germination. *Curr Opin Microbiol.* 6:550-556.

Silvaggi, JM., Popham, DL., Driks, A., Eichenberger, P., Losick, R. 2004. Unmasking novel sporulation genes in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186(23): 8089-95.

Sousa, C., Cebolla, A., de Lorenzo, V. 1996. Enhanced metalloadorption of bacterial cells displaying poly-His peptides. *Nat. Biotechnol.* 14: 1017–1020.

Sousa, C., Kotrba, P., Ruml, T., Cebolla, A., De Lorenzo, V. 1998. Metalloadorption by *Escherichia coli* cells displaying yeast and mammalian metallothioneins anchored to the outer membrane protein LamB. *J. Bacteriol.* 180: 2280–2284.

Stahl, S., Samuelson, P., Hansson, M., Andréoni, C., Goetsch, L., Libon, C., Liljeqvist, S., Gunneriusson, E., Binz, H., Nguyen, TN., Uhlén, M. 1997. Development of non-pathogenic staphylococci as vaccine delivery vehicles. In: Pozzi, G., Wells, JM. (Eds), *Gram positive Bacteria: Vaccine vehicles for mucosal immunization*. In Landes Biosciences, Georgetown, TX.

Stahl, S., and Uhlen, M. 1997. Bacterial surface display: trends and progresses. *Trends Biotechnol.* 15: 185-192.

Stevens, C. M., R. Daniel, N. Illing, and J. Errington. 1992. Characterization of a sporulation gene, *spoIVA*, involved in spore coat morphogenesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 174:586-94.

Suzuki, S., Izawa, Y., Kobayashi, K., Eto, Y., Yamanaka, S., et al. 2000. Purification and characterization of novel transglutaminase from *Bacillus subtilis* spores. *Biosci Biotechnol Biochem* 64: 2344-51

Valls, M., Atrian, S., de Lorenzo, V., Fernandez, LA. 2000. Engineering a mouse metallothionein on the cell surface of *Ralstonia eutropha* CH34 for immobilization of heavy metals in soil. *Nat Biotechnol* 18:661–665.

Valls M, de Lorenzo V, Gonzalez-Duarte R, Atrian S. 2000. Engineering outer-membrane proteins in *Pseudomonas putida* for enhanced heavy metal bioadsorption. *J Inorg Biochem* 79:219–223.

van Ooij, C., Eichenberger, P., and Losick, R. 1995. Visualization of the subcellular location of sporulation in *Bacillus subtilis* using immunofluorescence microscopy. *Mol. Microbiol.* 18: 459-470.

Wan, Y., Wu, Y., Zhou, J., Zou, L., Liang, Y., Zhao, J., et al. 2005. Cross presentation of phage particle antigen in MHC class II and endoplasmic reticulum marker-positive compartments. *Eur J Immunol* 35: 2041-50

Webb, C. D., A. Decatur, A. Teleman, and R. Losick. 1995. Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 177:5906-11

Westphal, A. J., Price, P. B., Leighton, T.J., and Wheeler, K. E. 2003. Kinetics of size changes of individual *Bacillus thuringiensis* spores in response to changes in relative humidity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:3461-3466.

Wu JY, Newton S, Judd A, Stocker B, and Robinson WS. 1989. Expression of immunogenic epitopes of hepatitis B surface antigen with hybrid flagellin proteins by a vaccine strain of *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:4726-30.

Zhang, J., Fitz-James, PC., Aronson, AI. 1993. Cloning and characterization of a cluster of genes encoding polypeptides present in the insoluble fraction of the spore coat of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 175: 3757-66.

Zheng, L., Donovan, W.P., Fitz-James, P.C., and Losick, R. 1988. Gene encoding a morphogenic protein required in the assembly of the

outer coat of the *Bacillus subtilis* endospore. *Genes Dev.* 2: 1047–1054.

Zilhao, R., Isticato, R., Martins, LO., Steil, L., Volker, U., et al. 2005. Assembly and function of a spore coat-associated transglutaminase of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 187: 7753-64

Zilhao, R., Serrano, M., Isticato, R., Ricca, E., Moran, C.P., Jr and Henriques, AO. 2004. Interactions among CotB, CotG and CotH during assembly of the *Bacillus subtilis* spore coat. *J Bacteriol* 186: 1110-1119.